



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**MIKROFLUIDICKÝ ENZYMATICKÝ REAKTOR PRO
TESTOVÁNÍ LÉČIV**

MICROFLUIDIC ENZYMATIC REACTOR FOR DRUG SCREENING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristýna Königsmarková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jan Přikryl, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1275/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kristýna Königsmarková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Přikryl, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Mikrofluidický enzymatický reaktor pro testování léčiv

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše shrnující oblast mikrofluidických enzymatických reaktorů a metod použitých v rámci diplomové práce.
2. Testování enzymatické aktivity pomocí spektrofotometrie a optimalizace podmínek testování enzymů jako modelu metabolismu potenciálních léčiv v játrech.
3. Návrh a výroba mikrofluidického zařízení z termoplastického materiálu OSTE (off-stoichiometry Thiol Ene) metodou "soft litografie" pro účely mikrofluidického enzymatického reaktoru.
4. Otestování mikrofluidického zařízení.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kristýna Königsmarková
student(ka)

Mgr. Jan Přikryl, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá využitím mikrofluidiky pro účely mikrofluidického enzymatického reaktoru na testování léčiv. Na problematiku nejprve nahlíží z teoretického hlediska – popisuje mikrofluidiku, jakožto nově se rozvíjející a perspektivní obor, metody výroby mikrofluidických zařízení, materiály, biomedicínské aplikace i výhody a nevýhody mikrofluidiky jako takové. Dále se věnuje oblasti analytického využití enzymů v rámci enzymatických reaktorů. V první části experimentální práce byly optimalizovány podmínky pro testování enzymů metabolismu xenobiotik v játrech, konkrétně na modelu metabolismu kumarinů metodou spektrofotometrie. Druhá část experimentální práce se zabývala optimalizací podmínek fabrikace mikrofluidických čipů z materiálu OSTE (off-stoichiometry Thiol-Ene) metodou "soft" litografie. Následně byla otestována funkčnost vyrobených čipů. Na základě výsledků obou částí experimentální práce bylo provedeno vyhodnocení s posouzením vhodnosti jejich propojení pro budoucí výzkum – testování enzymatické aktivity mikrosomů a modelové biotransformace léčiv uvnitř kanálků fabrikovaných zařízení.

ABSTRACT

This master thesis deals with the use of microfluidics for the purpose of microfluidic enzymatic reactor for drug screening. At first it considers the issue from a theoretical point of view – describes microfluidics as a newly developing and promising field of production of microfluidic devices, materials, biomedical applications and advantages and disadvantages of microfluidics overall. Furthermore, it focuses on an area of analytical utilization of enzymes within enzyme reactors. In the first part of the experimental section, conditions for the testing of enzymes of xenobiotics metabolism in the liver were optimized, namely the model of coumarin metabolism via the spectrophotometry method. The second part of the experimental work dealt with optimization of the fabrication conditions of microfluidic chips from OSTE (off-stoichiometry Thiol Ene) via the soft lithography method. Subsequently, the functionality of the produced chips was tested. Based on the results of both parts of the experimental work, an evaluation was carried out to assess the suitability of their interconnection for future research – screening of microsomal enzyme activity and model biotransformation of drugs within the channels of the fabricated devices.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrofluidika, lab-on-a-chip, "soft" litografie, OSTE, enzymatický reaktor, mikrosomy, kumariny

KEYWORDS

Microfluidics, lab-on-a-chip, soft lithography, OSTE, enzyme reactor, microsomes, coumarins

KÖNIGSMARKOVÁ, K. *Mikrofluidický enzymatický reaktor pro testování léčiv*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 71 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Jan Příkryl, Ph.D

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych chtěla poděkovat Honzovi Příkrylovi za odborné vedení mé diplomové práce na půdě Ústavu analytické chemie AV ČR. Především za jeho čas, ochotu ke konzultacím a vždy laskavý a milý přístup, díky kterému jsem se nikdy nebála za ním přijít, když se mi cokoli nedařilo. V neposlední řadě i za trpělivost, bez které by žádný mikrofluidický čip ani nemohl vzniknout.

Dále bych ráda poděkovala svým nejbližším spolužákům za to, že jsme se po celou dobu studia navzájem podporovali a pomáhali si navzájem zvládnout i ty nejtěžší zkoušky, kterým jsme čelili.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala mým rodičům a babičce, kteří mi společně byli oporou po celou dobu studia, bez nich by tato práce také nemohla vzniknout. Speciální poděkování patří mému příteli Mártymu za jeho nesmírnou obětavost a také první pomoc při zvládání všech stresových situací, které se vyskytly.

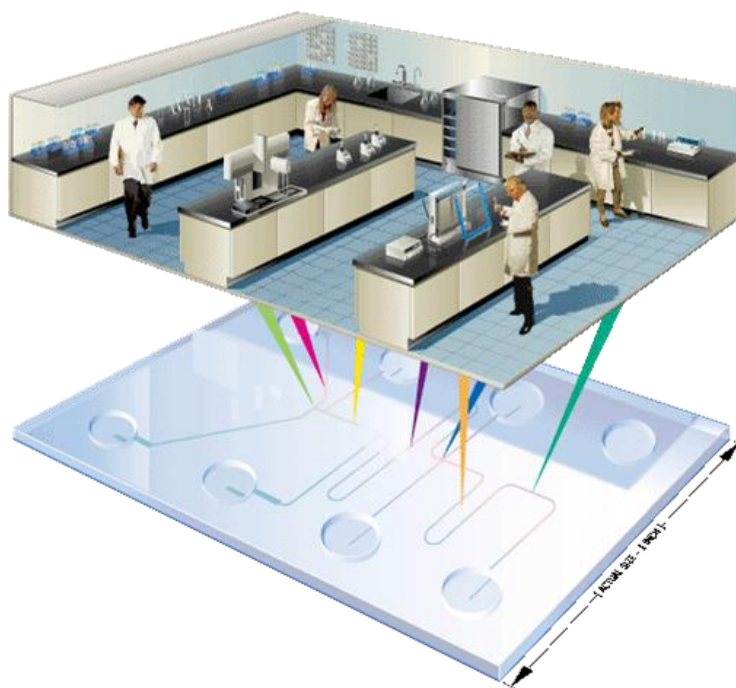
OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Mikrofluidika a lab-on-a-chip	8
2.1.1 Výhody a nevýhody technologie.....	9
2.1.2 Biomedicínské aplikace mikrofluidických čipů.....	9
2.1.2.1 Organ-on-chip	9
2.1.3 Materiály pro mikrofluidiku.....	10
2.1.3.1 PDMS (polydimethylsiloxan)	11
2.1.3.2 OSTE (off-stoichiometry Thiol-Ene).....	12
2.1.4 Metody výroby čipů	14
2.1.4.1 "Soft" litografie	14
2.1.5 Metody modifikace povrchů	16
2.2 Využití enzymů pro analytické účely	17
2.2.1 Enzymatické reaktory	17
2.2.2 Imobilizace enzymů	18
2.2.3 Typy mikrofluidických enzymatických reaktorů	19
2.2.3.1 "Open-tubular" mikroreaktory	19
2.2.3.2 Náplňové mikroreaktory	19
2.2.3.3 Monolitické mikroreaktory	20
2.2.3.4 Mikrofluidické reaktory na čipu	20
2.2.4 Aplikace mikrofluidických enzymatických reaktorů	21
2.3 Biotransformace xenobiotik	22
2.3.1 Enzymatická katalýza biotransformací	23
2.3.1.1 Komplex cytochrom P450 (CYP).....	23
2.4 Modelový systém a metodika testování biotransformačních procesů	25
2.4.1 Mikrosomální subcelulární frakce	25
2.4.2 Substráty pro testování enzymatické aktivity CYP.....	26
2.4.3 Spektrofluorimetrie	27
3 CÍL PRÁCE	29
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A DISKUZE VÝSLEDKŮ	30
4.1 Enzymatická část	31
4.1.1 Chemikálie a biologický materiál	31
4.1.1.1 Mikrosomální suspenze	31

4.1.2	Pomůcky a přístroje	32
4.1.3	Standardní postup přípravy reakční směsi pro stanovení enzymové aktivity CYP uvedený výrobcem	33
4.1.4	Příprava fosfátového pufru (PBS).....	33
4.1.5	Měření spekter jednotlivých komponent.....	33
4.1.6	Stanovení potenciálních vlnových délek vhodných pro další měření.....	36
4.1.7	Stanovení jedné optimální vlnové délky pro charakterizaci enzymové aktivity	37
4.1.8	Měření kalibrační závislosti konvenčním přístupem	40
4.1.9	Měření aktivity konvenčním přístupem	42
4.1.10	Ověření časové stability systému a měření fluktuace lampy	44
4.1.11	Vyhodnocení aktivity metodou NNLS	45
4.1.12	Vyhodnocení kalibrační závislosti metodou NNLS	47
4.2	Mikrofluidická část.....	48
4.2.1	Použité chemikálie	48
4.2.2	Pomůcky a přístroje	49
4.2.3	Fotolitografická výroba předlohy pro master.....	49
4.2.3.1	Silanizace	53
4.2.4	Výroba masteru	53
4.2.4.1	Odlévání PDMS pro tvorbu čipu	53
4.2.4.2	Odlévání PDMS pro tvorbu masteru	54
4.2.5	Výroba mikrofluidických čipů	55
4.2.5.1	Odlévání thiolenů.....	55
4.2.5.2	Kompletace čipů	56
4.2.6	Test funkčnosti mikrofluidických kanálků	57
5	ZÁVĚR	59
6	POUŽITÁ LITERATURA	61
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	69
8	PŘÍLOHY.....	70

1 ÚVOD

Během posledních desetiletí jsme byli svědky intenzivní miniaturizace a integrace ve většině vědeckých oborů. Tento vývoj můžeme zaznamenat například v oblasti elektroniky, kde nám jsou každým rokem představovány stále výkonnější a zároveň menší a menší počítače a chytré telefony. Trend miniaturizace se uplatňuje ale i v mnoha dalších oblastech vědy a také v analytických metodách. Jedním z cenných přístupů miniaturizace v biochemii a biomedicíně je mikrofluidika. Toto vědní odvětví otevírá prostor pro manipulaci s velmi malými objemy vzorků a činidel. Mikrofluidická zařízení, tzv. čipy nabízejí obecně nízkou spotřebu vzorku, a tím i nízké náklady na experiment. Nejen proto je tento přístup využíván v mnoha oborech, jejichž počet se stále rozšiřuje v závislosti na rozvíjení nových zařízení a metod. Mikrofluidické čipy se již používají v molekulární biologii, mikrobiologii, biomedicíně, toxikologii nebo například v oblasti syntetické chemie. Dále se výzkum zabývá rozšířením funkcí a přesnosti čipů. Motivací je vytvoření systému lab-on-a-chip (LoC), který integruje více laboratorních funkcí, jako jsou separace, transport a analýza vzorku na jediném čipu malého rozměru. V současnosti je také hodně diskutovaná a rozvíjená technologie organ-on-a-chip (OoC), kde se pomocí mikrofluidického čipu s kanálky osazenými buňkami simuluje tkáň nebo dokonce celý orgán. Výzkum výroby a aplikací mikrofluidických enzymatických reaktorů, kde se například prostřednictvím jaterních částic, tzv. mikrosomů simuluje biotransformace léčiv, rovněž otevírá nové možnosti pro odvětví testování, a to bez potřeby zvířat nebo dobrovolníků z řad pacientů [1, 2, 3, 4].

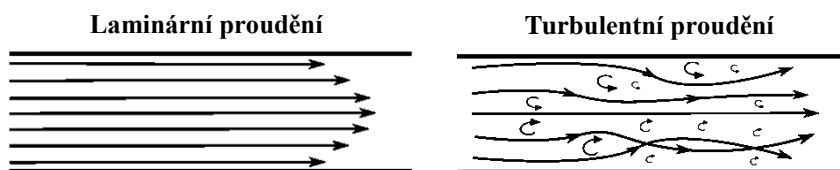


Obrázek 1: Technologie lab-on-a-chip (LoC) [5]

2 TEORETICKÁ ČÁST

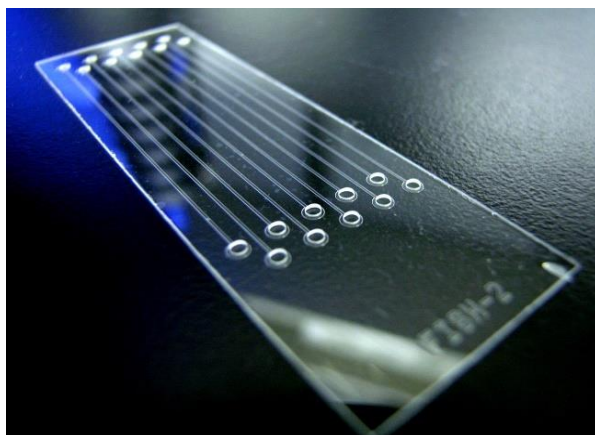
2.1 Mikrofluidika a lab-on-a-chip

Mikrofluidika se jako vědní obor zabývá manipulací s velmi malými objemy kapalin, konkrétně mikrolitry až femtolitry, v kanálcích o rozměrech cca 5–500 μm . Díky malým rozměrům kanálků mikrofluidických zařízení převažují kapilární síly společně s povrchovým napětím nad silou gravitační. Právě dominance kapilárních sil vytváří vhodné podmínky pro vznik laminárního proudění. Díky němu snadno dovedeme předvídat chování částic, kapalin v systému – dvě nebo více kapalin proudí paralelně vedle sebe, mísí se pouze pomocí difuze [1, 6].

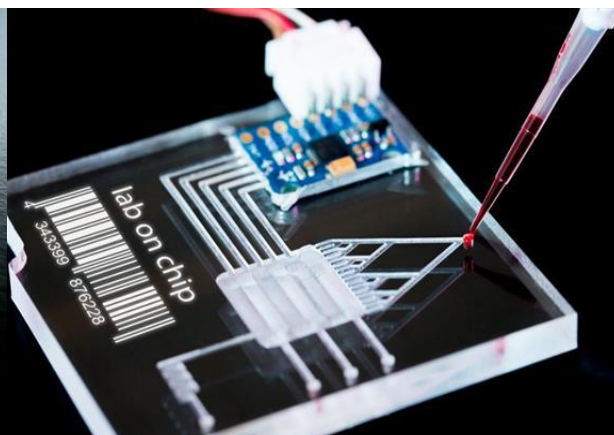


Obrázek 2: Schéma zobrazující rozdílnost dominujícího laminárního toku v porovnání s turbulentním [1]

Mikrofluidické čipy jsou souhrnná zařízení, která se zhotovují různými způsoby podle účelu, ke kterému je potřebujeme. Na obrázku 3 je zobrazen jednoduchý čip s nepropojenými mikrofluidními kanálky. Obrázek 4 prezentuje čip složitější, rozvětvený, s navzájem propojenými kanálky, obsahující i externí komponentu pro regulování toku kapaliny. Možné je zabudování i např. uzavěrů, mixérů, pump atd. Tyto složitější čipy mohou integrovat více laboratorních funkcí do jednoho komplexního čipu. Je možné, aby jeden čip s plochou, jejíž rozměry se pohybují v jednotkách několika čtverečních cm, nahradil všechny laboratorní procesy od separace po analýzu, a to při větší přesnosti a zároveň menší spotřebě vzorků. Tato technologie se nazývá LoC (lab-on-a-chip) [2, 6, 7].



Obrázek 3: Jednoduchý mikrofluidní čip [8]



Obrázek 4: Složitý, rozvětvený mikrofluidní čip s externí komponentou [9]

Dříve byly v praxi aplikovány čipy s kanálky obdélníkového průřezu, v současnosti jsou spíše používány kanálky s kruhovými průřezy a to proto, že v nich působí podél stěn jednotné smykové napětí a věrohodně imitují například chování cév *in vivo*. Podél hran obdélníkového kanálku se vytváří často nerovnoměrnosti ve velikosti působícího smykového napětí. Důsledkem těchto nerovnoměrností je neobvyklé chování částic, buněk v těchto kanálcích. Příkladem je typické zachycování leukocytů, které prvotně směřují do rohů obdélníkových kanálků [7, 10].

2.1.1 Výhody a nevýhody technologie

Mikrofluidickými kanálky protéká velmi malé množství kapaliny z čehož vyplývá, že největším přínosem metody je nízká spotřeba vzorku a s tím spojené i nízké náklady na experiment. Navíc existují i další výhody: zrychlení analýzy, vyšší výkonnost, efektivnost, kvalita výstupních dat aj. Mezi nevýhody mikrofluidických systémů patří především možné nepřesnosti při zhotovení čipů nebo nižší poměr signálu k šumu. I přesto je v dnešní době vývoji mikrofluidických čipů věnována čím dál větší pozornost – jejich aplikační potenciál je obrovský [1, 11].

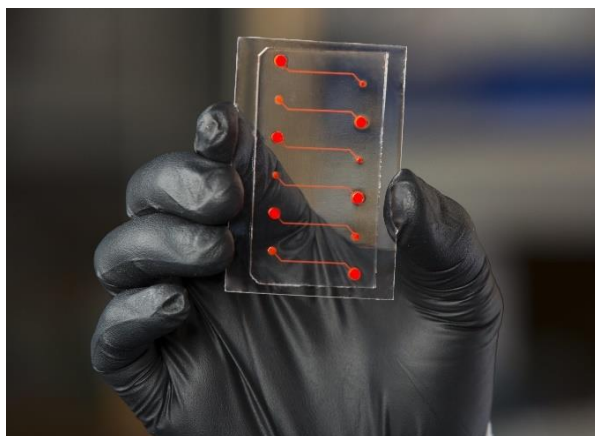
2.1.2 Biomedicínské aplikace mikrofluidických čipů

Možnosti využití mikrofluidických systémů lze rozdělit do několika skupin. První skupinou je analýza nebo syntéza biochemických materiálů (buněk, molekul), popř. diagnostika v rámci klinické biochemie. Příkladem takového využití budiž detekce přítomnosti protilátek HIV viru, za využití analýzy ELISA. Díky mikrofluidnímu čipu a levnému fotodetektoru mohou být výsledky naměřeny a vyhodnoceny do 20 minut, navíc i v místech, kde není dostatek financí na dostatečně vybavené laboratoře, např. v rozvojových zemích. Pomocí mikrofluidického čipu jde dnes i například monitorovat hladinu glukózy v krvi nebo diagnostikovat infarkt. Další skupina možností využití mikrofluidiky v praxi je simulace orgánů, včetně jejich funkcí i případných reakcí na chemické látky nebo léčiva. Tato technologie se nazývá organ-on-a-chip (OoC). Většina výše uvedených aplikací mikrofluidických čipů zahrnuje i využití tzv. enzymatických reaktorů, které podrobně popisuje kapitola 2.2.4 [12, 13, 14].

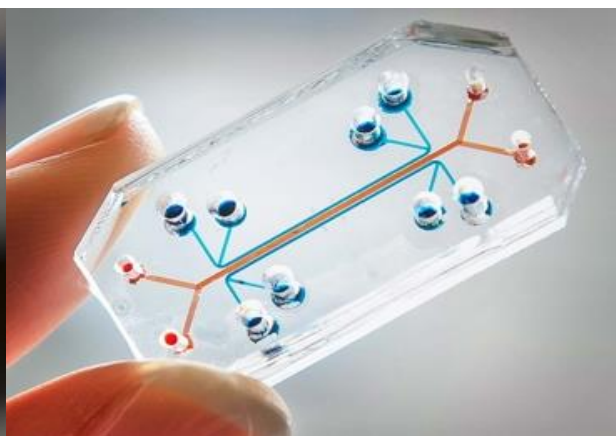
2.1.2.1 Organ-on-chip

Hlavní úskalí ve farmaceutickém průmyslu je extrémně vysoká cena vývoje a výroby nových léků a také jejich testování. Lidé užívají mnoho různých léků, které mají navzájem negativní vliv a testovat všechny různé kombinace je obtížné. Nejen tento zásadní problém nákladného a často i kontroverzního testování léčiv na pacientech či zvířatech by mohly začít řešit konstrukce mikrofluidických zařízení, kombinujících mechanické komponenty s živými buňkami. OoC je systém obsahující mikrofluidní kanálky lemované buňkami odpovídajících zkoumanému orgánu tak, aby věrohodně napodobovaly podmínky *in vivo*, a to na úrovni jednotlivých tkání. Pěstování takového orgánu vyžaduje buňky buď od pacienta, a nebo od zdravého subjektu. Může se jednat např. o kožní tkáň nebo krevní buňky. Přidáním genů se tyto buňky transformují na kmenové buňky, nazývané také indukované pluripotentní kmenové buňky. To znamená, že tyto buňky mohou růst do (téměř) libovolného buněčného typu. Navržené cévy, vlasečnice i jiné dutiny uvnitř umělého orgánu mohou napodobit systémy tkání mnohem účinněji, než buňky pěstované v Petriho misce, navíc se zde nabízí možnost daleko lépe ovládat podmínky experimentu. Dosud byly v praxi namodelovány systémy imitující například povrch plic, tenkého střeva, ledvin nebo krevních cév. Krevní cévy jsou obecně v praxi zatím simulovány nejvěrněji díky vlastnostem, jako je například objem průtoku krve nebo smykové tření na endoteliálních površích [7, 12, 15].

Pomocí mikrofluidního čipu se dá i sledovat průběh nebo diagnostikovat onemocnění. Například vaskulární demence – porucha zásobování mozku krví je v současnosti studována pomocí čipu, v jehož kanálcích proudí buněčný materiál pacientů postižených touto, převážně dědičnou chorobou. Vědci zatím bohužel nepřišli na to, jak tuto nemoc vyléčit, ale pomocí mikrofluidní technologie mohou zjistit, zda existuje lék, který by preventivně mohl potlačit nebo výrazně zpozdit tuto chorobu. V současnosti také probíhají výzkumy astmatického onemocnění pomocí lung-on-a-chip technologie. Nejen v tomto případě je transparentnost materiálu velkou výhodou technologie OoC. Poskytuje volný pohled do vnitřního fungování lidských plic, aniž by se muselo jakkoli invazivně narušit lidské tělo. Lung-on-a-chip má potenciál být cenným nástrojem pro testování účinků environmentálních toxinů, absorpce aerosolizovaných terapeutik i účinnosti nových léků. Takový nástroj může pomoci urychlení farmaceutického vývoje tím, že omezí závislost na současných modelech, ve kterých testování jedné látky může stát více než 2 miliony dolarů [15, 16, 17].



Obrázek 5: Krevní kapiláry na čipu
(Blood-vessel-on-a-chip) [17]



Obrázek 6: Plíce na čipu (Lung-on-a-chip) [18]

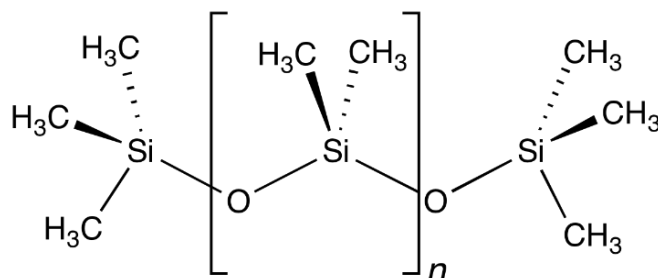
2.1.3 Materiály pro mikrofluidiku

Mezi nejdůležitější faktory při výrobě mikrofluidního čipu s ohledem na konkrétní aplikaci patří: cena, náročnost zpracování a životnost. Zejména pro čipy s využitím v biomedicině je důležité, aby nevykazovaly toxicitu a byly biokompatibilní. Důležitá je také pružnost, prostupnost materiálu pro určité typy molekul (např. odpadní látky buněk) nebo smáčivost povrchu [12].

Díky optickým vlastnostem a dobře prostudovaným výrobním postupům, se čipy prvotně vyráběly hlavně ze skla a křemíku. Jejich nevýhodou byla křehkost a vysoké náklady na výrobu. Nicméně jejich největší limitace použití byla v biologických oborech při práci s buňkami kvůli neschopnosti propouštět plyny. V průběhu času a rozvoje metod se staly polymery a elastomery mnohem vhodnějšími materiály, a to s ohledem na cenu, čas i náročnost práce při výrobě. Mikrofluidické čipy se experimentálně zhotovují v kombinaci sklo-sklo, sklo-polymer nebo polymer-polymer. Mezi polymery s větším uplatněním patří například: polydimethylsiloxan (PDMS), polyethyltereftalát (PET), OSTe (off-stoichiometry thiol-ene), polykarbonát (PC), polystyren (PS) nebo polymethylmetakrylát (PMMA). Dále mohou být uplatněny i některé biopolymery, např. pryskyřice, želatina nebo agaróza, [1, 2].

2.1.3.1 PDMS (*polydimethylsiloxan*)

PDMS, také známý jako pod názvem dimethikon, je řazen do skupiny polymerních organokřemičitých sloučenin, tzv. silikonů. V roce 1998 byl poprvé představen v rámci mikrofluidických aplikací Georgem Whitesidesem. Tento milník výrazně změnil možnosti výroby i využití čipů, nejen po funkční ale také po ekonomické stránce [1, 19, 20].



Obrázek 7: Strukturní vzorec PDMS [21]

Jedná se o elastomer v mikrofluidice velmi využívaný a to nejen pro fabrikaci čipů, ale i odlévacích forem, tzv. masterů. Mezi jeho největší výhody kromě cenové dostupnosti patří také elasticita, měkkost, biokompatibilita, nízká toxicita, elektrická nevodivost a průhlednost. PDMS je nepropustný pro vodu v kapalném skupenství, propouští plyny a nepochybně organická rozpouštědla, s organickými rozpouštědly není kompatibilní. Díky své elasticitě umožňuje zavedení pump a dalších externích prvků, které slouží k regulaci průtoku kapaliny uvnitř zařízení [20, 22].

Nejčastěji diskutovanou nevýhodou tohoto materiálu je jeho hydrofobnost. Povrch PDMS lze různě chemicky modifikovat tak, aby se zvýšila jeho smáčivost, což je také velmi důležitý faktor při imobilizaci buněk v mikrofluidních kanálcích. Povrchové úpravy PDMS jsou však poměrně nestabilní, kovalentní vazby vázané s funkčními skupinami pouze krátkodobé. Tento jev zapříčiňuje volně zesíťované, siloxanové řetězce, které se různě otáčejí a zakrývají. PDMS se vyznačuje i dalšími vlastnostmi, kvůli kterým jsou jeho aplikace nevhodné pro průmyslovou výrobu ve velkém měřítku. Mezi tyto nevýhody patří např. rozměrová nestálost mikrofluidických kanálků způsobená elasticitou (a s tím se pojící nedostatečná mechanická pevnost komerčních produktů) či některé výrobní kroky, jako je pomalé tepelné vytvrzování nebo ruční manipulace s tenkými elastomerními fóliemi [20, 22, 23].

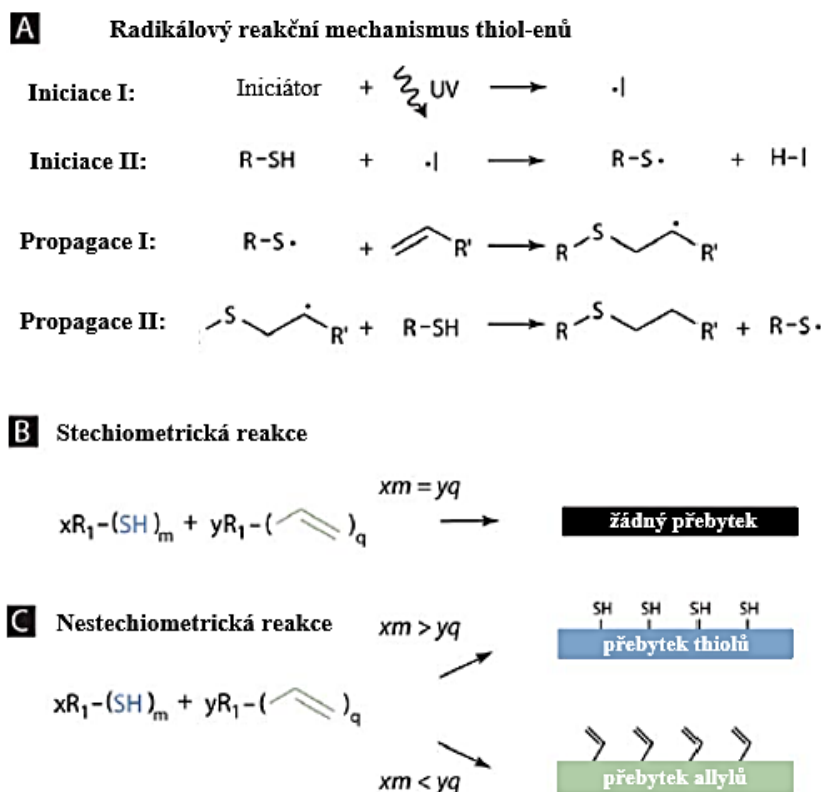
Aplikace PDMS jsou velmi rozmanité, používá se pro výrobu kontaktních čoček a jiných zdravotnických prostředků, je také přítomen v šamponech (pro lesk vlasů) nebo v některých potravinách pod označením E900 (protipěnicí aditivum). Využívá se i v oblasti těsnění a lubrikačních prostředků [24, 25, 26, 27].

V případě této diplomové práce byly z PDMS vyrobeny formy pro odlévání směsi thiol-enových monomerů. Tyto formy umožnily následný přenos vzorů kanálků o velikostech v řádech mikrometrů na povrch materiálu OSTE. Fabrikace PDMS masteru probíhala v několika krocích, počínaje fotolitografií na vrstvě negativního fotorezistu – touto metodou byl vytvořen prvotní reliéf kanálků. Všechny kroky jsou dále v práci podrobněji popsány [20].

2.1.3.2 OSTE (off-stoichiometry Thiol-Ene)

Polymerové pryskyřice OSTE byly původně vyvinuty, aby svými výhodami překonaly propast mezi výzkumem laboratorních prototypů založených např. na PDMS a komerční produkcí mikrofluidických čipů, typicky probíhající tlakovým vstřikováním plastů. Toto je umožněno tím, že OSTE mikrofluidické čipy lze vyrobit jednak UV zářením nebo teplem iniciovanou polymerací v laboratoři běžnou, stejně tak embossováním nebo vstřikováním používaném v průmyslu [28, 29].

Polymerace OSTE je založena na reakci thiolové a allylové funkční skupiny, která se řadí k tzv. „click“ reakcím, což jsou reakce vyznačující se vysokým výtěžkem, selektivitou, stereospecifitou, modulárností a jednoduchostí. Často probíhají za mírných podmínek (běžná rozpouštědla, laboratorní teplota aj.). Díky tomu jsou často využívány ke konjugacím biomolekul [29].



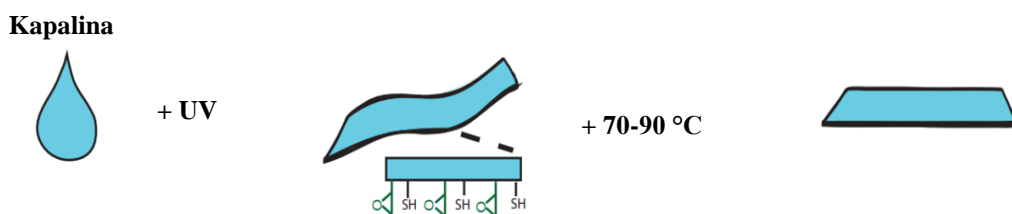
Obrázek 8: (A) Reakční mechanismus spojování radikálových thiol-enů; (B) Standardní stechiometrická reakce thiol-enových systémů, která vede k úplné polymeraci a nepřítomnosti funkčních skupin na povrchu i v objemu; (C) Nestechiometrická reakce thiol-enů umožňující vznik nezreagovaných thiolových i allylových funkčních skupin [28]

V případě polymerace OSTE jsou často využívány vícevazné monomery sloužící k zesíťování, a tím větší pevnosti materiálu (např. čtyřvazný monomer obsahující thiolové skupiny a trojvazný polymer obsahující dvojné vazby). OSTE, oproti stechiometrickým směsím, poskytují několik výhod. Laděním složení směsi lze dosáhnout různých mechanických vlastností materiálu nebo vytvoření reakčních center pro další „click“ reakce [28, 30].

Po úplné fotoiniciované polymeraci se OSTE fabrikáty vyznačují určitým obsahem nezreagovaných thiolových/allylových skupin na povrchu i v objemu. Počáteční míra nestechiometrie monomerů přesně definuje počet skupin, které zůstanou po polymeraci volné. Nezreagované funkční skupiny lze poté použít pro přímou modifikaci povrchu nebo pro suché lepení dvou a více OSTE výrobků navzájem. Reakční mechanismy UV iniciovaných radikálových reakcí thiol-enů a rozdíly mezi reakcemi stechiometrických a nestechiometrických směsí monomerů zobrazuje podrobně obrázek 8 [28, 29, 31].

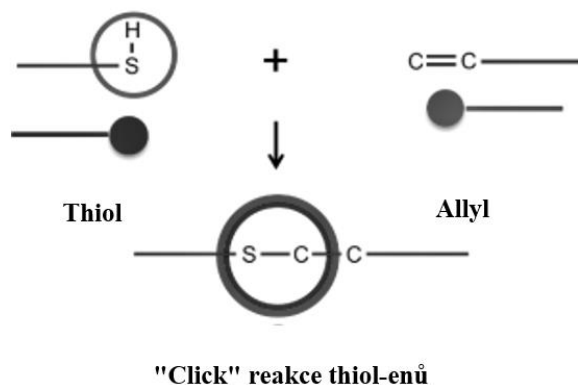
Dalším rozšířením možností OSTE materiálu je využití přídavku epoxy-monomerů. Vznikne tak systém thiol-ene-epoxy-monomerů, tzv. OSTE+, který byl již upraven a vylepšen švédskou firmou Mercene Labs AB s komerčním názvem OSTEMER. Vytvrzování této pryskyřice sestává ze dvou odlišných kroků. První krok je UV iniciovaný, thiol-enovou reakcí se tvoří snadno deformovatelný, elastický polymer s nadbytkem nezreagovaných thiolů a všech epoxidů [29, 32].

Ve druhém kroku dochází důsledkem tepelně iniciovaných reakcí všech zbývajících thiolových a epoxidových skupin k tuhnutí. Vzniká zcela neohebná, inertní pryskyřice s nízkou propustností pro plyny, schopná biokompatibility s mnoha buněčnými liniemi. Oba kroky procesu vytvrzování jsou znázorněny na následujícím schématu [33, 34].



Obrázek 9: Schéma tvrzení materiálu OSTE+ [35]

Mezi hlavní výhody OSTE pryskyřic se řadí snadná a rychlá výroba složitých struktur, přirozené hydrofilní povrchové vlastnosti či snadná modifikací povrchu „click“ reakcemi. Dále také schopnost suchého lepení polymeru s přebytkem thiolů na druhý s přebytkem allylů při laboratorní teplotě nebo možnost stabilního a hustého rozložení nezreagovaných skupin, řízeného stupněm nestechiometrie. Naopak nevýhodou tohoto materiálu je jeho negativní vliv na buňky a proteiny při vyplavování nezreagovaných monomerů z čipu. Tato skutečnost je způsobena zpravidla aplikací směsí s velmi vysokými nestechiometrickými poměry. Schopnost biokompatibility tedy spolehlivě poskytují pryskyřice OSTE se složením blízkým stechiometrickému [28, 32, 36].



Obrázek 10: Znázornění thiol-enové „click“ reakce [37]

Aplikace OSTE polymerů patří mezi nejnovější technologie. Materiál je díky svým vlastnostem vhodný pro komerční výrobu systémů LoC. Poskytuje platformu pro rychlé prototypování, která vyžaduje minimálních investic, navíc je kompatibilní se stávajícími mikrofabricačními technikami. Dále nachází využití i při konstrukcích biosenzorů, také se vyvíjí poměr monomerů vhodný pro medicínské aplikace – nosiče léčiv a scaffoldy pro regeneraci tkání [28, 33, 34, 37].

V rámci experimentální části diplomové práce byly kombinací obou typů pryskyřic, OSTE i OSTE+, vyrobeny tři mikrofluidické čipy.

2.1.4 Metody výroby čipů

Existuje velké množství výrobních metod pro mikrofluidická zařízení. Jednotlivě se liší v náročnosti provedení, cenovou dostupností, možnostmi tvarů a velikostí mikrofluidních kanálků aj. Čipy mohou být vyráběny nejen v jednodušším 2D provedení, ale i jako 3D modely, u kterých roste náročnost výroby. Používáním PDMS se široce rozvinula technologie zvaná "soft" litografie (tzv. měkká litografie), která je dnes vůbec jednou z nejpoužívanějších technik pro výrobu mikrofluidních čipů. Kromě této metody se využívá i mnoho dalších postupů, mezi které patří například galvanické pokovování, tvorba kanálků vyleptáváním do křemíku, mikrokontaktní tisk, laserová ablace, ražení za tepla nebo vstřikování. Dále také i velká škála metod 3D tisku, např. FDM ("fused deposition modelling" – modelování depozicí taveniny), polyjet (lepení práškového materiálu lepidlem nanášeným tryskami), DLP/SLA ("digital light processing"/stereolitografie, fotopolymerace kapalného materiálu) a další. Následující kapitola popisuje metodu, která byla využita pro fabrikaci čipů v rámci experimentální části předložené diplomové práce [1, 2, 7].

2.1.4.1 "Soft" litografie

Princip techniky "soft" litografie spočívá v odlévání PDMS do předlohy (nejčastěji křemíkové) se strukturou požadovaného mikrofluidického zařízení. Předloha se zhotovuje převážně pomocí fotolitografie [2].

Fotolitografie je metoda, díky které je možné na plochem substrátu vytvořit kanálky, jejichž rozměry se mohou pohybovat až v mikroměřítku. Její provedení je velmi pracné, citlivé na sebemenší změnu podmínek vůči danému protokolu a také vyžaduje čisté prostory, nejlépe

s vhnáným, přefiltrovaným vzduchem. To proto, aby se zabránilo znehodnocení fabrikátů prachovými částicemi [38].

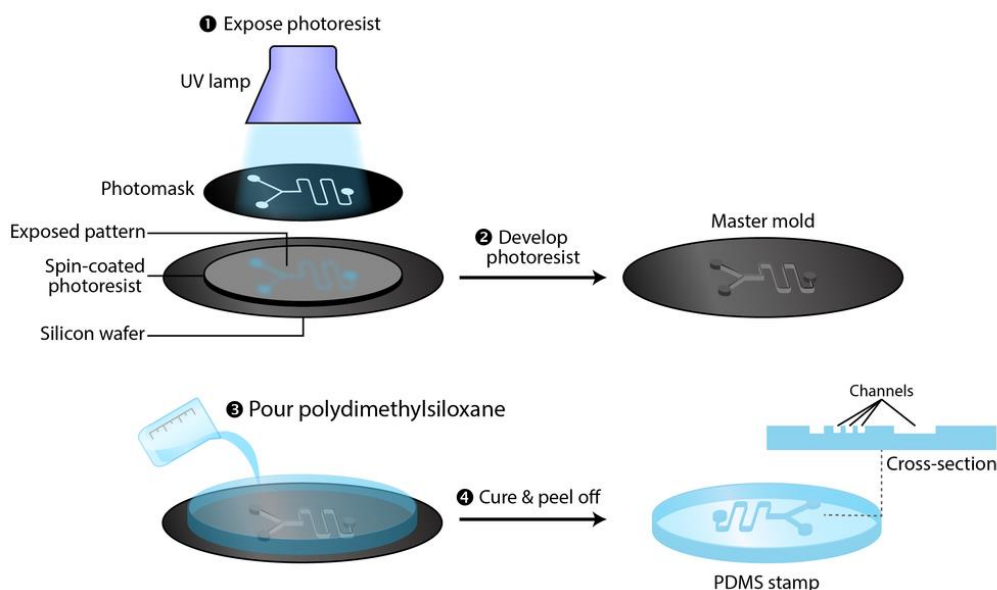
Fotocitlivý materiál, tzv. fotorezist je v procesu fotolitografie nanesen v tenké vrstvě ("spin coatingem", "dip coatingem" apod.) na substrát, poté zakryt fotomaskou a vystaven UV osvitu. Masky jsou nejčastěji chromované, protože chrom nepropouští UV záření tam, kde je potřeba a nezakryté části mohou být účinkem záření zpolymerizovány resp. rozloženy, podle typu fotorezistu, který použijeme (negativní resp. pozitivní). Podle typu fotorezistu je nutné volit i variantu masky (tzv. pozitiv nebo jemu negativ). Chromové masky se vyznačují větší značnou odolností, čemuž odpovídá i jejich vyšší cena. Cenově dostupnější variantou masek jsou masky nanesené na fotofilm, kde průchodu UV záření zabraňuje barvivo [38, 39, 40].

Negativní fotorezisty vyžadují fotomasky, které mají většinu své plochy zakryté. Nekryté oblasti jsou vystaveny UV záření, které způsobí uvolnění iniciátoru, poté následuje tepelně iniciovaná polymerace v místech výskytu iniciátoru, během které se postupně projeví vystouplé kanálky na předloze. Nezpolymerovaný materiál je po tepelném, vytvrzovacím kroku vyplaven pomocí vyvíječe, kterým je směs organických rozpouštědel. Naopak u pozitivních fotorezistů jsou exponovaná místa chemicky narušena a stanou se rozpustné ve vyvíjecím roztoku. Ve vyvíjecím kroku je rozložený materiál následně odplaven, a tím se místo výstupků tvoří jamky. Hlavní výhodou pozitivních fotorezistů je jejich neměnný tvar během polymerace. Díky tomu se jeví jako vhodnější pro aplikace, při kterých je kladen důraz na přesnost. Finálně zhotovenou předlohu je možné při správné manipulaci a vhodném uchovávání několikanásobně znova využít [38, 39].

V experimentální části práce byla fotolitograficky vyrobena předloha pro odlévací formu pomocí negativního fotorezistu SU-8 3025. Všechny kroky jsou dále v práci podrobněji popsány.

Po zhotovení předlohy, na jejímž povrchu vystupuje struktura kanálků, je možné dále postupovat v procesu "soft" litografie. Obecný postup probíhá v několika následujících krocích: Nalítí viskózní směsi oligomerů PDMS společně se síťovacím činidlem a následná polymerace. Nejčastěji se PDMS nechává vytvrdit na topné desce při 70 °C po dobu 1-2 hod. Následuje sejmutí zpolymerovaného PDMS z povrchu křemíkové předlohy, poté přichycení odlitku s vytvořenými kanálky na podklad. Podkladem může být například sklo nebo jiná vrstva PDMS. Před přichycením PDMS vrstvy na jiný povrch je do něj potřeba vyříznout otvory, pro vstup kapaliny do mikrofluidního kanálku [7, 19].

PDMS sloupnutý z předlohy se také velmi často používá jako master pro další odlévání a to nejen dalšího PDMS, ale i pro tvorbu čipů dalších materiálů. Mastery lze užít opakovaně pro výrobu několika čipů, dokud nedojde k jejich opotřebení [19].



Obrázek 11: Schéma tvorby čipu za použití metody soft litografie [41]

2.1.5 Metody modifikace povrchů

Princip povrchové funkcionalizace „click“ reakcemi u OSTE pryskyřic byl popsán v kapitole 2.1.3.2. Pro modifikaci povrchu skleněných nebo silikonových materiálů je nutné využití zcela odlišných technologií. Nejčastěji se využívá velká škála silanizačních technik nebo zpracování povrchu plazmatem [42, 43].

Silanizace je proces, při kterém se povrch materiálu zcela pokryje organofunkčními alkokoxysilanovými molekulami. Silanizované mohou být materiály jako např. sklo, slída, křemík, protože obsahují hydroxylové skupiny, které napadají a vytěsňují alkokoxyskupiny na silanu, čímž se tvoří kovalentní $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ vazba. Cílem této techniky je vytvoření vazby přes rozhraní mezi minerálními složkami a organickými složkami. Materiály modifikované silany mohou být dále reaktivní i zcela nereaktivní, záleží na typu použitého silanu a navázaných funkčních skupinách, např. $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$ aj. Tato metoda obecně nachází velké uplatnění ve výzkumu biomateriálů. Aplikací silanů na skleněné povrchy se např. zvyšuje jejich hydrofobnost, čehož se využívá i při kultivaci buněk za účelem snížení jejich přilnavosti ke stěnám kultivačních nádob. Jedním z nejvíce využívaných silanů je 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES). Při jeho použití se na podklad naváže vrstva zakončená reaktivní aminoskupinou, vhodná k dalším reakcím [42, 44, 45].

Modifikací nejen chemických, ale i fyzikálních vlastností povrchů se dá docílit použitím plazmatu. Tato technologie zahrnuje : aktivace povrchů plazmatem, leptání, lepení, čištění, polymerace aj [43].

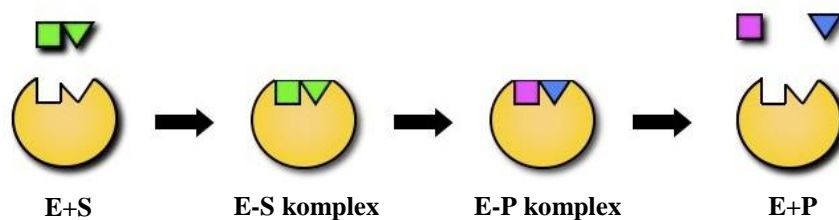
V rámci předložené diplomové práce byly skleněné i PDMS povrchy zbaveny nečistot plazmatem. Ke spojování vrstev PDMS a skla bylo také využito plazmatu. Nepřilnavosti povrchu bylo dosaženo silanizací za použití trichloro(1H, 1H, 2H, 2H-tridekafluoro-n-oktyl)silanu. Navázáním fluorovaných uhlovodíků bylo docíleno nereaktivity materiálů a zabránilo se i případnému nežádoucímu nalepení jednoho dílu PDMS na druhý nebo OSTE k PDMS. Konkrétní postupy jsou popsány v experimentální části.

2.2 Využití enzymů pro analytické účely

Enzymy, jakožto vysoce účinné a selektivní biokatalyzátory, zajišťují a řídí průběh chemických reakcí v buňkách organismů. Jejich základní skelet, apoenzym je složen z proteinů, na které se často váží i další molekuly, označované jako kofaktory. Kofaktory se podílí např. na přenosu atomů nebo elektronů a určují funkci daného enzymu. Podle způsobu navázání na bílkovinnou strukturu enzymu se kofaktory dělí na pevně vázané prostetické skupiny a koenzymy vázané slabými vazebnými interakcemi [46].

Enzymatické reakce fungují na principu přeměny substrátů v produkty, která probíhá v tzv. aktivním místě enzymu, viz obrázek 12. Průběh reakcí je enzymy zrychlován na základě snížení aktivační energie potřebné pro chod dané reakce. Nicméně žádná enzymatická reakce neprobíhá stejně rychle. Existuje několik faktorů ovlivňujících rychlost, např. množství substrátu, množství enzymu, teplota nebo pH [47, 48].

Během biochemických reakcí se enzymy nespotřebovávají, zůstávají nezměněné a mohou být znovu použity. V dnešní době se ve výzkumu i v průmyslu využívá velká škála enzymů volných i imobilizovaných. Nedílnou součástí praktických aplikací je i konstrukce a využití různých typů enzymatických reaktorů [47, 48].



Obrázek 12: Obecný průběh enzymatické reakce; vysvětlivky: E - enzym, S - substrát, P – produkt [49]

2.2.1 Enzymatické reaktory

Reaktorem je označováno zařízení, ve kterém probíhají chemické reakce. Průběh konverze substrátu na produkt prostřednictvím enzymatické reakce probíhá v enzymatických reaktorech. Výběr zařízení pro konkrétní proces v praxi závisí na několika důležitých faktorech. Ty zahrnují například formu zvoleného enzymu (volná nebo imobilizovaná), kinetiku reakce, chemické a fyzikální vlastnosti imobilizačního nosiče včetně toho, zda se jedná o částicový, membránový nebo např. vláknitý materiál. Pozornost musí být věnovaná také rozsahu provozu, možné potřebě regulace reakčních podmínek: teplota, pH aj. Dalšími faktory jsou např. dodávky a odstraňování plynů, stabilita enzymu, substrátu a produktu. Nezbytné je i komplexní zhodnocení nákladů spojených s pořízením substrátu, enzymu, vývojem procesu, výstavbou a celkovým provozem enzymatického reaktoru [50, 47].

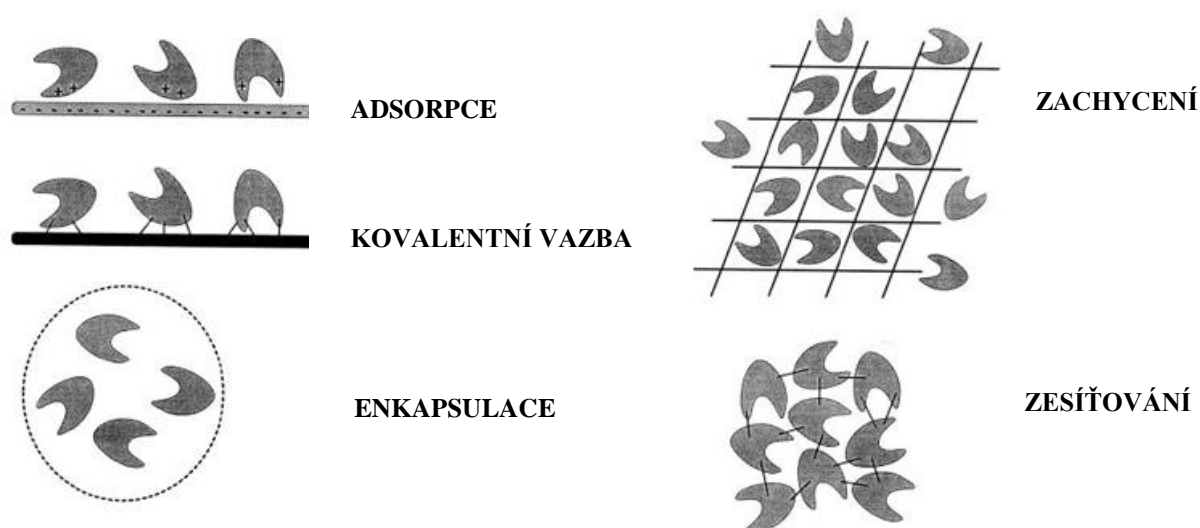
Enzymatické reaktory se základně dělí dle způsobu imobilizace enzymů na: vsádkové ("batch") a průtočné nebo kontinuální reaktory ("flow-through", "continuous"). Výhody plynoucí z aplikací průtočných reaktorů se jednoznačně týkají zjednodušení postupů, které umožňují snadnější automatizaci, bezpečnější provoz, reprodukovatelnost a nižší produkční náklady v porovnání s reaktory vsádkovými. S pokroky ve výzkumu analytické oblasti mikrofluidiky se v posledních letech začaly v praxi uplatňovat i průtočné mikrofluidické enzymatické reaktory [50].

2.2.2 Imobilizace enzymů

Práce s enzymy je obecně kromě mnoha výše uvedených výhod spojovaná i s nevýhodami, jako jsou např. vysoká pořizovací cena za malé množství biokatalyzátoru nebo omezená stabilita. U enzymů volně rozpuštěných v reakční směsi dochází k jejich ztrátám při různých post separačních procesech. Metody imobilizace enzymů v praxi naopak pomáhají se těmito problémům vyvarovat, což má za důsledek i zjevné ekonomické úspory [48].

Imobilizace spočívá v ukotvení enzymu na pevný nosič. Pevná fáze nosiče je separovaná od fáze kapalné, ve které je rozpuštěn substrát, zároveň jsou obě tyto fáze v těsném kontaktu. Pevný nosič je tvořen zpravidla polymerem, na který je různými chemickými a fyzikálními vazbami připojen enzym [51, 52].

Existuje mnoho metod navázání enzymů, nejčastěji se využívá například adsorpce, kovalentní vazba, enkapsulace, zachycení nebo zesíťování. Schémata vybraných imobilizačních postupů zobrazuje obrázek 13.



Obrázek 13: Schémata vybraných imobilizačních metod [51]

Dále jsou v praxi využívány i některé další fyzikální postupy. Jednou z nejstarších, nejlevnějších a nejjednodušších metod je fyzikální sorpce na nosič, ke které se nicméně pojí i několik nevýhod, např. značná nespolehlivost a malá stabilita. Enzymy, organely nebo i celé buňky lze také imobilizovat inkorporací do gelových matic. Tyto matrice mohou být tvořeny nejen syntetickými polymery, ale i biopolymery jako je např. želatina, kolagen, agaróza nebo algináty. Avšak hlavním problémem aplikace této fyzikální metody je riziko postupného uvolňování látky zabudované v matici do kapalné fáze [52, 53].

Imobilizace kovalentními vazbami je dnes nejčastěji používanou metodou a to proto, že vykazuje vyšší účinnost v porovnání s ostatními metodami. Pro tento postup je nezbytná přítomnost funkčních skupin na pevném nosiči, např.: $-NH_2$, $-SH$, $-OH$, $-COOH$ aj. Navázání požadovaných biokatalyzátorů na tyto skupiny je zprostředkováno po jejich aktivaci různorodými činidly. Na tomto principu funguje i imobilizace na povrchu materiálu OSTE, kterému se věnuje této diplomové práce. Podstata imobilizace biomolekul zde spočívá v jejich interakci s postranními, thiolovými ($-SH$) skupinami [52, 53].

2.2.3 Typy mikrofluidických enzymatických reaktorů

Následující podkapitoly obsahují podrobnější popisy jednotlivých typů enzymatických mikroreaktorů s imobilizovanými enzymy (tzv. IMER).

2.2.3.1 "Open-tubular" mikroreaktory

"Open-tubular" enzymatické reaktory s konstrukcí otevřené kapiláry využívají jako nosič pro imobilizaci enzymů povrch vnitřní stěny. V tomto případě je dostupná plocha relativně malá, což je přímo spojeno s výslednou nízkou nosností biomolekul. Pro heterogenní biokatalýzu, kdy substrátový roztok prochází enzymem potaženou kapilárou, je poměr povrchu k objemu mnohem menší ve srovnání s mikroreaktory náplňovými nebo monolitickými. Tato skutečnost má negativní vliv na účinnost reakce v důsledku prodloužené dráhy difuze substrátů a tedy i nízkou rychlost enzymatické konverze. Z toho důvodu je důležité zajistit přiměřeně dlouhou dobu pobytu reakční směsi v mikroreaktoru, která umožní difuzi substrátových molekul do aktivních míst imobilizovaného enzymu. Ze stejného důvodu by vnitřní průměr kapiláry měl být tak malý, aby bylo možné snížit potřebnou vzdálenost difuze a zvýšit poměr povrchu k objemu [54].

Jedním z řešení vedoucích ke zvýšení aktivního povrchu pro imobilizaci enzymů je vytvoření přídatné vrstvy na vnitřním povrchu kapiláry. Vyšší nosnost může být dosažena potažením například vrstvou dextranu nebo porézního monolitu. Takové mikroreaktory poskytují minimální odpor proudění (a nízký zpětný tlak), což je velmi výhodné z praktického hlediska při průchodu reakčních směsí kapilárou. Důležité je také poznamenat, že v tomto přístupu jsou interakce mezi molekulami substrátu a nosičem omezeny na minimum, takže analyty jsou méně zadrženy. "Open-tubular" mikroreaktory mohou být také inkorporovány do mikrofluidního čipu [54, 55].

2.2.3.2 Náplňové mikroreaktory

Tento typ mikroreaktorů běžně využívá pro imobilizaci enzymů nano a mikročástice, jakožto materiály s velkou plochou povrchu s velikostí v rozsahu 50-100 μm , např.: uhlíkové nanotrubice, zlato, magnetické nanočástice, mezoporézní křemíkové kuličky. Použití této technologie může však představovat několik nevýhod, které často vedou k nízké účinnosti. Mikroreaktory naplněné částicemi trpí nízkou difúzní schopností rozpuštěných makromolekulových látek do pórů pomocného materiálu. Pokud je doba zdržení roztoku procházejícího kapilárou příliš krátká, imobilizovaný enzym má omezený kontakt se substráty. Tento problém vyplývá z nízké rychlosti difuze molekul do pórů částic, ve kterých je enzym přítomen. Další velkou nevýhodou je nutnost použití separačních technik na post-reakční směsi, např. ultrafiltrace nebo centrifugace, aby se odstranily částice a získal supernatant vhodný k analýze. Avšak v průběhu separací často dochází ke ztrátám. V současné době jsou komerčně dostupné různé typy funkcionalizovaných nosičů i enzymové preparáty na bázi perliček [54, 56].

Jako velmi výhodné se jeví aplikace magnetických částic a to proto, že nevyžadují žádné složité separační techniky, aby se zabránilo jejich eluci z kapiláry. Magnetické částice mohou být umístěny v jakémkoliv požadovaném fragmentu pomocí vnějšího magnetického pole a pro jejich odstranění se používá tatáž snadná a rychlá metoda. Z tohoto důvodu se tyto částice

často používají pro imobilizaci enzymů a biokatalýzu v roztoku. Po procesu mohou být jednoduše získány magnetickou separací z post-reakční směsi, např. po screeningu enzymových inhibitorů nebo i po štěpení proteinů [57].

2.2.3.3 Monolitické mikroreaktory

Pro překonání problémů uvedených v podkapitole o náplňových mikroreaktorech může sloužit např. aplikace alternativní metody, mikroreaktorů na bázi monolitu. Jednodílné lůžko představuje homogenní strukturu, složenou z průtočných makropórů a mikropórů, které zajišťují vysoký specifický povrch. Mikroreaktory na bázi monolitů vykazují velkou účinnost při relativně nízkém protitlaku (díky přítomnosti průchozích pórů) v důsledku snížené délky difúzní dráhy a rychlého přenosu hmoty. Kromě toho jsou monolitické nosiče schopny vázat relativně velké množství biomolekul, vzhledem k vysoké hustotě reaktivních funkčních skupin. Vykazují také vysokou mechanickou životnost [54, 58].

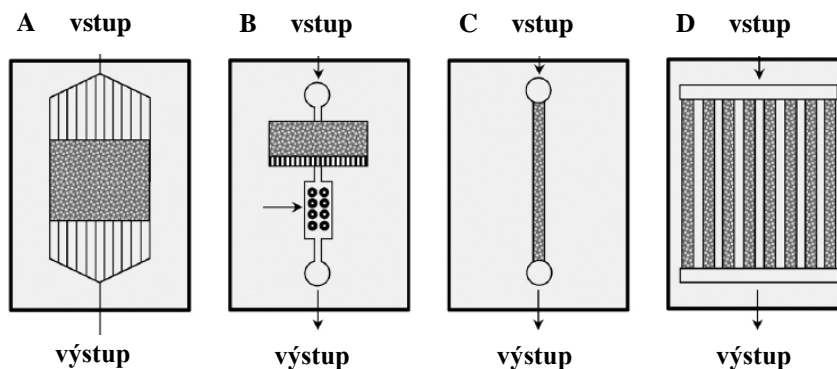
Syntéza monolitických nosičů probíhá uvnitř mikrokanálu (kapiláry, čipu), z čehož často může plynout i nevýhoda časové náročnosti přípravy a potýkání se s problémem při opakovatelnosti. Monolity jsou tvořeny radikálovou polymerací, např. tepelně nebo foto-iniciovanou, dále také polykondenzací nebo lyofilizací. Fotoiniciace vyžaduje průhledné materiály a umožňuje přípravu monolitické podpory v přesně definované části kanálu kapiláry při použití vhodné masky. Kromě toho tato metoda také umožňuje imobilizaci enzymu na určité části monolitu. V nejvhodnějším případě jsou monolity syntetizovány v jednostupňovém procesu a vyznačují se velkým objemem pórů ($1\text{--}2\text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$) a vysokou plochou povrchu ($4300\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$). Na těchto materiálech, které se vyznačují velkým množstvím aktivního povrchu, uplatňují enzymy vysokou katalytickou účinnost [54, 58, 59].

Rozlišují se tři typy monolitických loží: organické, anorganické a hybridní. Organické monolity jsou biokompatibilní a odolné vůči extrémním hodnotám pH, ale v přítomnosti organických rozpouštědel může dojít k narušení jejich struktury. Naproti tomu křemičité základy (nejčastěji používané mezi anorganickými monolity) jsou odolné vůči organickým rozpouštědlům, ale jejich stabilita při extrémních hodnotách pH je nízká [54].

2.2.3.4 Mikrofluidické reaktory na čipu

Pro aplikaci mikroreaktorů na čipu mohou být využity všechny výše uvedené přístupy včetně monolitických lůžek, perliček i "open-tubular" kanálů. Obecně se IMER na čipu navzájem liší konstrukcí i materiály, z nichž jsou vyrobeny. Tato skutečnost by měla být kompatibilní s detekční technikou používanou pro stanovení produktů generovaných v reakční oblasti. Samotná enzymatická přeměna může probíhat v připravené jamce, komoře nebo kanálu – jednoduchém, složitém, rozvětveném v přímém nebo klikatém tvaru, viz obrázek 14. Platí, že výtěžek reakce závisí na délce přímého úseku kanálu a počtu ohybů. Je důležité také zdůraznit, že v mikrofluidických kanálech je proud kapaliny laminární a přenos hmoty probíhá hlavně difúzí. Míchání kapalin lze dosáhnout dodáním energie z vnějšku, např. ultrazvukovými komponentami. Klikaté kanály jsou využívány jako pasivní technologie pro mísení kapaliny průběžnými změnami směru proudění [54, 60, 61].

Stále víc jsou využívána multifunkční čipová zařízení (LoC), která zajišťují průběh reakce, separaci produktů a jejich analýzu na jediné platformě. V takových případech je proces rychlejší, účinnější, reprodukovatelnější a bývá dosaženo i větší citlivosti ve srovnání s kroky prováděnými odděleně nebo ve větším měřítku [2].



Obrázek 14: Vybrané typy mikroreaktorů na čipu: A-s jamkou, B-s komorou, C-s jednoduchým kanálem, D-s větším počtem jednoduchých kanálů; ■ Reakční prostor (s imobilizovanými enzymy) [54]

Vstupy mikroreaktorů na čipu pro následné připojení kapilár mohou být monolitické (nejčastěji u fabrikátů 3D tisku), adhezivní (lepené) nebo na bázi kontaktního zapojení (pružné otvory) [62].

2.2.4 Aplikace mikrofluidických enzymatických reaktorů

Během posledních desetiletí jsme svědky ohromných pokroků ve výzkumu enzymologie i mikrofluidiky. Nejnovější vědecké poznatky popisují přístupy, které umožňují uplatnění enzymatických reaktorů v mnoha oblastech vědy – v bioanalytických laboratořích, průmyslu i v lékařství.

Technologie IMER se využívá například pro kvantifikaci cílových analytů nebo pro separaci činidel. Dále pro syntézu sloučenin, které je obtížné získat klasickými chemickými reakcemi. Mikroreaktory jsou také používány pro výběr vhodných podmínek biokatalýz nebo pro analýzu nákladů a přínosů před zavedením enzymatického procesu do většího měřítku. Enzymová specifita nachází své praktické využití v biosenzorech nebo v analytických zařízeních v proteomice. Další praktické aplikace se pojí ke studiu kinetiky enzymů nebo hledání jejich účinných inhibitorů, které mohou být potenciálně využity jako farmaceuticky účinné látky [54, 63].

Nelze předpovědět jaká aplikace bude v blízké budoucnosti převažovat, v každém případě mnohé studie dokazují, že potenciál IMER je obrovský.

2.3 Biotransformace xenobiotik

Cizorodé sloučeniny, mezi které se řadí i léčiva, jedy nebo průmyslové chemikálie, jsou v tělech organismů přeměňovány na metabolity procesem známým jako biotransformace. Jedná se o sled chemických reakcí, zprostředkovaných jaterními i mimojaterními enzymy. Xenobiotika lipofilního charakteru jsou prostřednictvím enzymatické katalýzy transformovány na látky polárnější, hydrofilní. Tímto způsobem se zvýší rychlost jejich vylučování, které může probíhat např. močí, žlučovými cestami aj. Je důležité poznamenat, že k detoxifikaci nedochází v každém případě. Procesem biotransformace mohou vznikat také látky s rozdílnými či více toxickými vlastnostmi než tomu bylo v případě sloučeniny původní nebo metabolity schopné dalších interakcí s tkání i buňkami [64, 65].

Léky mohou podstoupit jednu ze čtyř potenciálních možností biotransformace: přeměnu aktivního léku na neaktivní nebo aktivní metabolit (konkrétně případ prodloužení terapeutického účinku léčiva), dále také neaktivního léku na aktivní metabolit (využití u proléčiv). V některých případech probíhá přeměna aktivního léku na jeho toxický metabolit, tzv. biotoxifikace. Příkladem biotoxifikace je například přeměna polycyklických aromatických uhlovodíků v metabolity karcinogenní [65].

Biotransformační procesy, kterých se konkrétně účastní léčiva, lze rozdělit na nesyntetické reakce I. fáze a syntetické reakce II. fáze.

Reakce I. fáze

Zahrnují nejčastěji oxidační, méně často redukční a hydrolytické reakce. V průběhu této fáze dochází k transformaci léčiva na polárnější metabolit zavedením nebo odkrytím funkčních skupin: $-NH_2$, $-SH$, $-OH$, $-COOH$ aj. Molekula se takto stává polárnější a následně dochází snadnějšímu vyloučení. Obecně při nesyntetických reakcích dochází ke tvorbě méně aktivních metabolitů, v některých případech mohou vznikat i metabolity po aktivní stránce nezměněné (např. transformace diazepamů na nordiazepam) nebo aktivnější. V reakcích I. fáze mohou vznikat také toxiny (např. metabolity paracetamolu) [64, 65].

Reakce II. fáze

Do syntetické fáze vstupují látky málo polární (produkty I. fáze), které podstoupí kovalentní připojení malých hydrofilních molekul, jako je např.: kyselina glukuronová, octová, glycin nebo aktivovaný sulfát za vzniku látek lépe rozpustných ve vodě. Tyto děje probíhají prostřednictvím konjugčních enzymů. Vzniklé konjugáty mají větší molekulovou hmotnost, v pH prostředí jsou ionizovány a snadno vyloučeny z organismu [65, 66].

Výzkum biotransformačních reakcí je potřebný nejen k optimalizaci a vývoji toxikologických metod, ale také při testování působení nových medikamentů s důrazem na účinnější léčbu nemocí a omezení nežádoucích účinků [64].

2.3.1 Enzymatická katalýza biotransformací

Biotransformace léčiv probíhá nejčastěji v játrech, zprostředkovávají ji ale také další orgány např. ledviny, plíce, srdce, žaludek (typické pro peniciliny) aj. Subcelulárně jsou biotransformační enzymy situovány v cytosolu, endoplasmatickém retikulu (ER) a v mitochondriích [64].

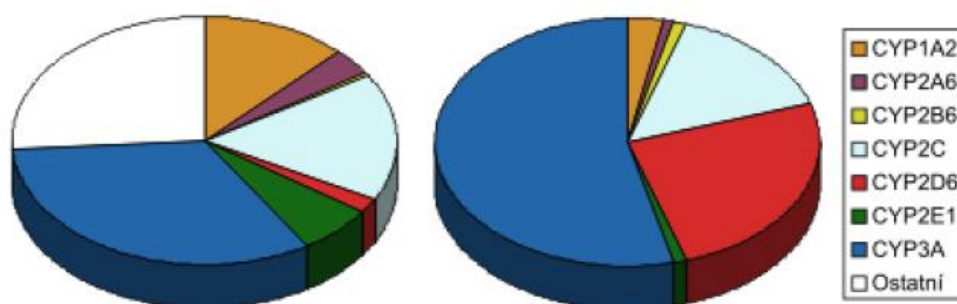
V játrech probíhají přeměny uvnitř hepatocytů pomocí mikrosomálních enzymů. Transformační reakce léčiv v buňkách ovlivňuje mnoho typů biokatalyzátorů, nejvýznamnější je ovšem oxidační reakce v komplexu cytochrom P450. Biotransformační enzymy ovlivňuje řada faktorů mezi které patří: pohlaví, věk, mezidruhové rozdíly, potrava, genetické faktory nebo celkový zdravotní stav organismu [64, 67].

2.3.1.1 Komplex cytochrom P450 (CYP)

Oxidační systém cytochrom P450 (CYP), kterým se tato práce mimo jiné zabývá, je tzv. superrodinou enzymů odpovědných za eliminaci zhruba 75 % všech xenobiotik. Výzkum a pochopení biotransformace pomocí CYP je proto jedním z nejdůležitějších kroků při objevování léčiv [46, 68].

Komplex CYP byl na počátku objeven jako buněčný pigment obsahující atom železa s koordinačním číslem 6 inkorporovaný do struktury porfyrinu, tento celek se označuje jako hem. Číslovka 450 v názvu představuje hodnotu absorpčního maxima systému při redukovaném stavu železa v komplexu s CO. Systém se dělí na rodiny, podrodiny a konkrétní enzymy. Označení konkrétního enzymu ze superrodiny P450 sestává z předpony CYP, následovanou arabskou číslicí označující rodinu a velkým písmenem pro popis podrodiny. Celé označení zakončuje další arabská číslice, která značí konkrétní enzym např. CYP2A6. Na biotransformaci xenobiotik se podílejí rodiny označované číslicemi 1, 2 a 3, nejčastěji konkrétně 1A, 2B, 2C, 2D a 3A. Systém CYP je situován na membránách ER, mitochondrií či mikrosomů. Vyznačuje se rozmanitostí sekvencí aminokyselin a substrátovou specifitou, která určuje typ konkrétního izoenzymu [68, 69, 70].

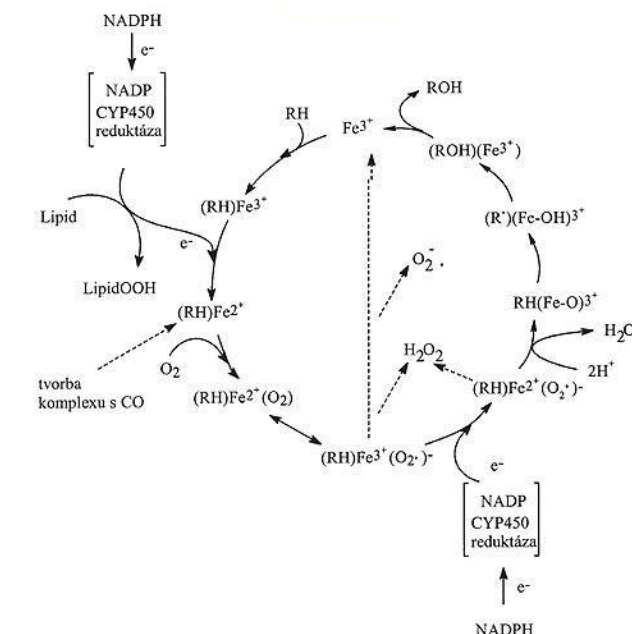
Průměrný podíl jednotlivých izoenzymů
na celkovém P450 v játrech



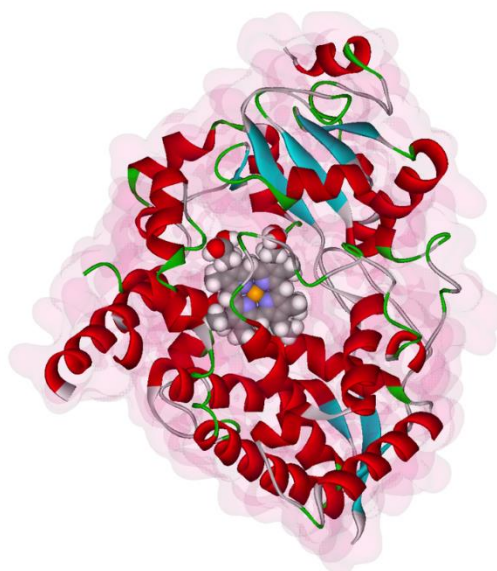
Průměrný podíl jednotlivých izoenzymů
na metabolismu léčiv

Obrázek 15: Grafické znázornění podílů jednotlivých izoform v játrech a v rámci metabolismu léčiv [71]

Lidský organismus obsahuje přibližně 60 rozdílných forem CYP. Pro správný průběh oxidačních reakcí katalyzovaných monooxygenázou je mimo samotný komplex nezbytná i přítomnost těchto dalších sloučenin: NADPH-cytochrom P450-reduktázy, kofaktoru NADPH a molekulárního kyslíku. Schéma kompletního cyklu oxidace zobrazuje obrázek 16. Kompletně závislé na systému CYP jsou i některé další metabolické reakce jako např. deaminace, hydroxylace nebo N-, O-, S-dealkylace [68, 70].



Obrázek 16: Katalytický cyklus enzymatického systému CYP [72]



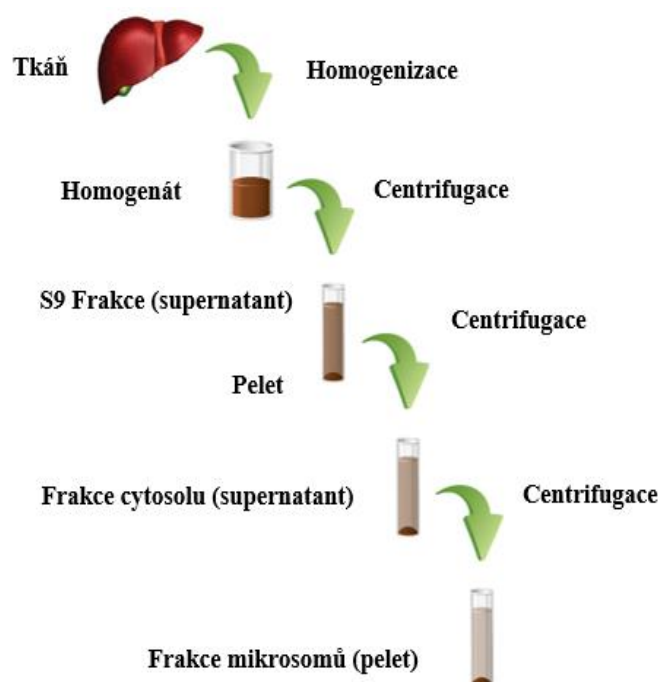
Obrázek 17: Stuhový model 3D uspořádání CYP [73]

2.4 Modelový systém a metodika testování biotransformačních procesů

Testování stávajících i nově syntetizovaných léčiv je v jaterním prostředí za podmínek *in vivo* velmi komplikované. Tuto skutečnost způsobují mnohé důvody – legislativní, ekonomické, technologické i etické. Proto je velký důraz kladen na vývoj a optimalizaci metody testování metabolických procesů xenobiotik *in vitro*. Jedním z přístupů pro vytvoření modelového systému je využití subcelulárních frakcí, mezi které patří např. izolované mikrosomy, mitochondrie, jádra, cytosol nebo proteiny. Tyto frakce obsahují komplex CYP, jsou schopné substrátové přeměny. Post-reakční směsi obsahující biotransformační produkty jsou poté analyzovány. Pro analýzu a měření enzymatické aktivity se používá např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kapilární elektroforéza (CE), hmotnostní spektrometrie (MS) nebo spektrofotometrie [74, 75, 76, 77].

2.4.1 Mikrosomální subcelulární frakce

Aplikace mikrosomů *in vitro* je v dnešní době velmi rozšířená v jakémkoli výzkumu biotransformace léčiv i při preklinických studiích. Částice tohoto modelového systému jsou velmi citlivé a je nutné je optimálně skladovat, viz experimentální část kapitola 4.1.1.1. Mikrosomální frakce se získává z čerstvé jaterní tkáně lidí i zvířat, kompletní schéma izolace zobrazuje obrázek 18. Pomocí mikrosomů je možné zhodnotit stabilitu metabolismu, druhové rozdíly při metabolizaci konkrétního xenobiotika, mapovat i inhibovat enzymy [74, 75].



Obrázek 18: Schéma izolace subcelulární frakce mikrosomů [75]

2.4.2 Substráty pro testování enzymatické aktivity CYP

Seznam chemických látek, vhodných jako substrát komplexu CYP, obsahuje zhruba tisíc různých sloučenin. Následující tabulka zobrazuje soupis některých substrátů pro konkrétní izoenzymy CYP [78].

Tabulka 1: Přehled substrátů a produktů pro konkrétní izoenzymy CYP [78]

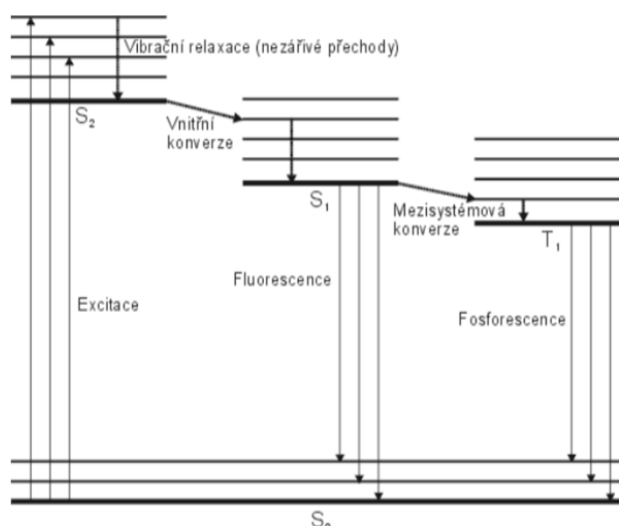
Typ CYP	Substrát	Produkt/komerční název
CYP1A2	3-kyano-7ethoxykumarin (CEC)	3-kyano-7-hydroxykumarin (CHC)
	7-ethoxykumarin (7-HC)	7-hydroxykumarin (7-HC/umbeliferon)
CYP2C9	dibenzylfluorescein (DBF)	fluorescein
	7-methoxy-4-(trifluoromethyl)-kumarin (7-MFC)	7-hydroxy-4(trifluoromethyl)-kumarin (7-HFC)
CYP2D6	7-methoxy-4-(aminomethyl)-kumarin (MAMC)	7-hydroxy-4-(aminomethyl)-kumarin (HAMC)
	3-[2-(N,N-diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylkumarin (AMMC)	3-[2-(diethylamino)-ethyl]-7-hydroxy-4-methylkumarin (AHMC)
CYP3A4	7-benzyloxyquinolin (7-BQ)	quinolinol
	benzylresorufin	resorufin
	di(benzyloxymethoxy)fluorescein (DBF)	fluorescein

V rámci diplomové práce byl sledován 7-ethoxykumarin a jeho přeměna pomocí mikrosomů v produkt 7-hydroxykumarin, tzv. umbeliferon. Alkoxykumariny se obecně řadí mezi významné substráty pro sledování biotransformace xenobiotik, a to zejména díky snadnému chodu O-dealkylačních reakcí. Další výhodou využití těchto látek *in vitro* je vysoká citlivost při testování, produkt 7-hydroxykumarin se vyznačuje vysokou fluorescencí. Zabránění přeměny substrátu v produkt může v tomto případě dojít použitím flavonoidů, které inhibují O-deethylaci 7-ethoxykumaxinu. Produkt 7-hydroxykumarin v biotransformačních reakcích II. fáze podléhá konjugaci s kyselinou glukoronovou, tím se stává rozpustnějším ve vodě, což umožňuje jeho snadnější eliminaci z organismu [78, 79].

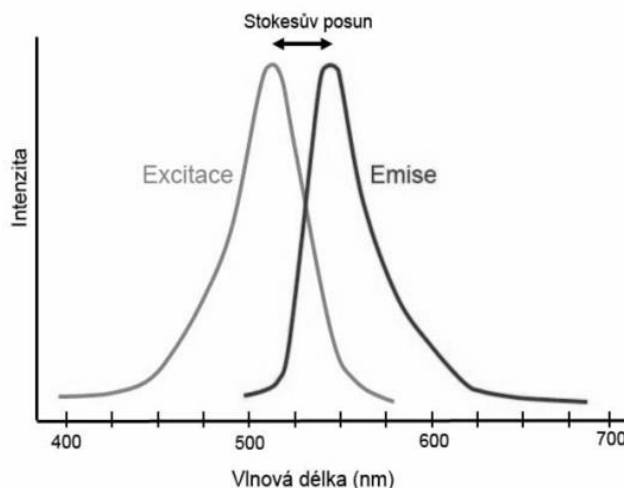
2.4.3 Spektrofluorimetrie

Spektrofluorimetrie je jedna z metod vhodných pro analýzu modelových biotransformačních systémů i měření enzymatické aktivity CYP. Využívá luminiscenčního jevu fluorescence. Při pohlcení světla fluoreskující látkou (aromatickou molekulou), dochází pomocí fotonů k excitaci valenčních elektronů ze základní hladiny do hladiny energeticky vyšší. Po odstranění excitačního zdroje dochází k návratu elektronu do původní hladiny, což je charakterizováno vyzařením energie ve velmi krátké době, řádově 10^{-9} až 10^{-6} s. Pokud záření přetrvává (i několik minut a více), nejedná se již o fluorescenci, nýbrž o fosforescenci. Ve většině případů má emitované světlo delší vlnovou délku, a tedy nižší energii, než absorbované záření. Procesy mezi absorpcí a emisí světla znázorňuje Jablonského diagram [80, 81].

Pro excitační a emisní spektrum většiny fluoreskujících látek platí pravidlo zrcadlové symetrie, které je podmíněné stejnou relativní pravděpodobností absorpce i emise ze souhlasných vibračních hladin. Energetický rozdíl mezi maximy excitačního a emisního spektra se označuje jako Stokesův posun, viz obrázek 20. Tento posun je vždy charakteristický pro danou látku a je neměnný nastavením spektrofotometru [80].



Obrázek 19: Jablonského diagram znázorňující fotoluminiscenční procesy [82]



Obrázek 20: Excitační a emisní spektrum [83]

Obečně platí, že spektrofluorometry používají zdroje světla s vysokou intenzitou (např. xenonové výbojky), aby vzorek byl co nejvíce ozařován fotony. To umožňuje i maximální počet molekul v excitovaném stavu v kterémkoli okamžiku. Záření prochází monochromátorem, v tomto konkrétním případě mřížkou, kde je jejím pootočením vybrána požadovaná vlnová délka. Světlo dále dopadá na vzorek v křemenné kyvetě, intenzita emise je sbírána kolmo ke zdrojovému paprsku. Předtím než emisi detekuje fotonásobič, projde dalším monochromátorem, který filtruje vhodné vlnové délky pro měření na vyhodnocovacím zařízení. Pro měření excitačního spektra přístroj měří všemi excitačními vlnovými délkami při jediné emisi, naopak pro získání emisního spektra je třeba zvolit jednu excitaci, při které se se proměří všechny vlnové délky emisní [80, 81].

Mezi faktory ovlivňující fluorescenci patří například přítomnost kyslíku (zhášení), pH, teplota, pokles viskozity, intenzita excitačního záření nebo délka optické dráhy [81].

3 CÍL PRÁCE

Tato práce se zabývá sestavením mikrofluidického zařízení pro účely mikrofluidického enzymatického reaktoru jako modelu metabolismu potenciálních léčiv/xenobiotik v játrech.

Cílem první části diplomové práce je prověření systému pro testování enzymatické aktivity pomocí spektrofotometrie a optimalizace podmínek testování enzymů.

Cílem druhé části diplomové práce je návrh a optimalizace metody výroby mikrofluidického zařízení z termoplastického materiálu OSTF (off-stoichiometry Thiol Ene) technikou "soft litografie" s následným otestováním funkčnosti zařízení.

Poté na základě výsledků obou částí experimentální práce provést vyhodnocení, srovnání výhod a nevýhod obou metod určených pro testování modelu metabolismu potenciálních léčiv. Následně posoudit vhodnost propojení obou celků pro budoucí výzkum – testování enzymatické aktivity mikrosomů a tím i modelové biotransformace léčiv uvnitř kanálků fabrikovaných čipů.

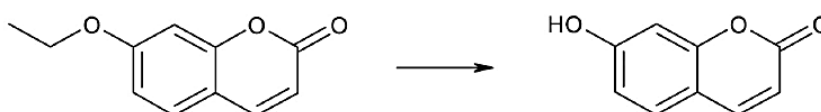
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A DISKUZE VÝSLEDKŮ

Experimentální část diplomové práce je logicky členěna na výše zmíněné, dvě rozsáhlejší kapitoly. Pro větší přehlednost při čtení práce byly výsledky i diskuze sepsány společně v rámci jednotlivých podkapitol.

Simulace metabolismu biotransformace léčiv:

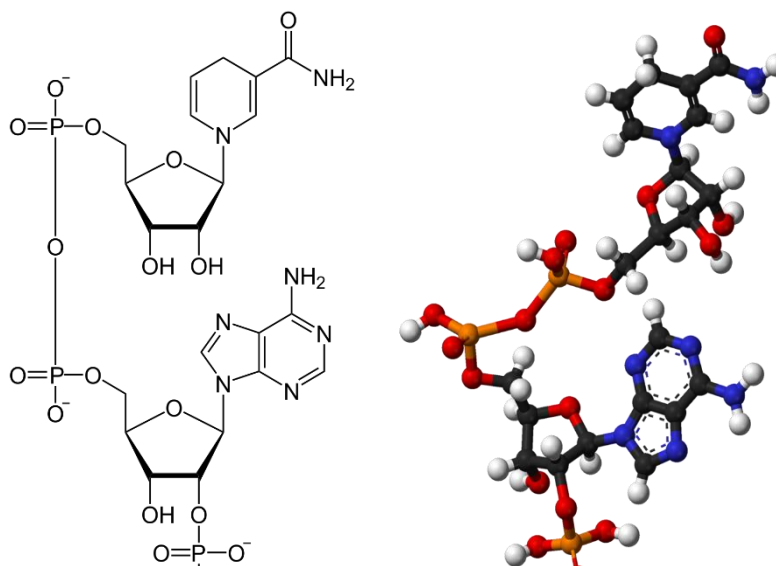
V průběhu experimentů byl simulován metabolismus biotransformace xenobiotik. Výchozí látka 7-ethoxykumarin (7-EC) byla pomocí komplexu enzymů cytochromu P450 (CYP), obsaženého v jaterních mikrosomech, přeměněna na 7-hydroxykumarin (7-HC), viz Obrázek .

Pro správný chod metabolického děje je nutná přítomnost vhodného koenzymu, v tomto 7-ethoxykumarin (substrát) 7-hydroxykumarin (produkt)



Obrázek 21: Schéma přeměny 7-EC na 7-HC: O-dealkylace [84]

případě se jednalo o redukovanou formu nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH). Redukovaný NADPH se v CYP zoxiduje, tím dojde k redukci látky jiné, 7-EC se přemění na 7-HC. Na stejném principu funguje i biotransformace xenobiotik, např. léčiv v konkrétních organismech, přeměna účinných látek léčiv v játrech na látky neúčinné, proaktivní [85].



Obrázek 22: Schéma struktury a 3D konformace koenzymu NADPH [86]

4.1 Enzymatická část

První polovina experimentální části diplomové práce byla zaměřena na optimalizaci metody charakterizace enzymatické aktivity CYP. Vycházelo se z poznatků popsaných v dokumentaci výrobce mikrosomální suspenze Sekisui XenoTech. Tato společnost standardně volí pro charakterizaci enzymatické aktivity kumariny a metodu kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS. V rámci této diplomové práce byla však pro měření zvolena a následně otestována možnost využití metody spektrofotometrie, jako instrumentace s výrazně nižšími pořizovacími a provozními náklady. Motivací bylo ověřit použitelnost spektrofluorimetrické analýzy systému 7-EC/7-HC a poté otestovat funkci mikrosomů sledováním enzymatické aktivity. Následně byla zhodnocena vhodnost jejich aplikace do mikrofluidního kanálku, viz kapitola 4.2 Mikrofluidická část.

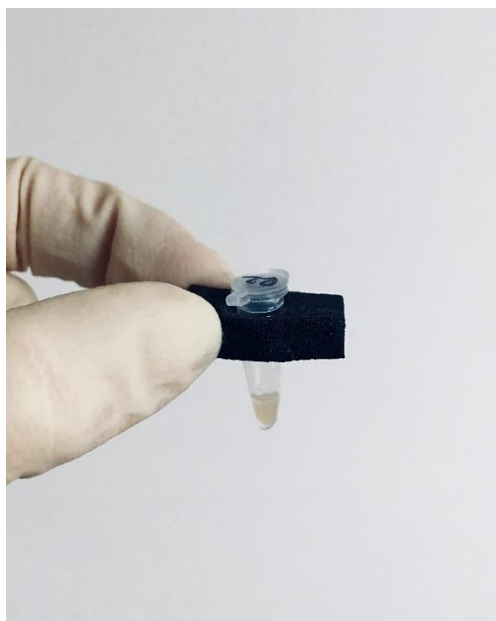
4.1.1 Chemikálie a biologický materiál

V rámci práce byly použity následující látky: fosfátový pufr (PBS – Phosphate Buffered Saline) složený z KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a K_2HPO_4 (MDP ChemControl, Slovensko); MgCl_2 (Lachema, ČR), EDTA (Fluka, Německo), 7-ethoxykumarin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 7-hydroxykumarin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), NADPH (Tokyo Chemical Industry, Japonsko), deionizovaná H_2O , ethanol pro UV spektrofotometrii (LachNER, ČR) a suspenze mikrosomů (Sekisui XenoTech, USA).

4.1.1.1 Mikrosomální suspenze

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, mikrosomy jsou jaterní subcelulární frakce. Tento biologický materiál se v dnešní době používá velmi rozšířeně nejen při preklinických studiích nově vytvořených léčiv, ale i v jakémkoli jiném výzkumu biotransformací xenobiotik nebo toxinů. Jedná se o velmi citlivé částice s nutností optimálního skladování. Je velmi důležité, aby se mikrosomy skladovaly při nízkých teplotách, standardně $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. I po vyjmutí z mrazicího boxu, následném rozmrazení a těsně před jejich aplikací do systému, je nutné je uchovávat na ledu. Při špatném skladování a zacházení může dojít ke snížení enzymové aktivity oxidáz CYP [75].

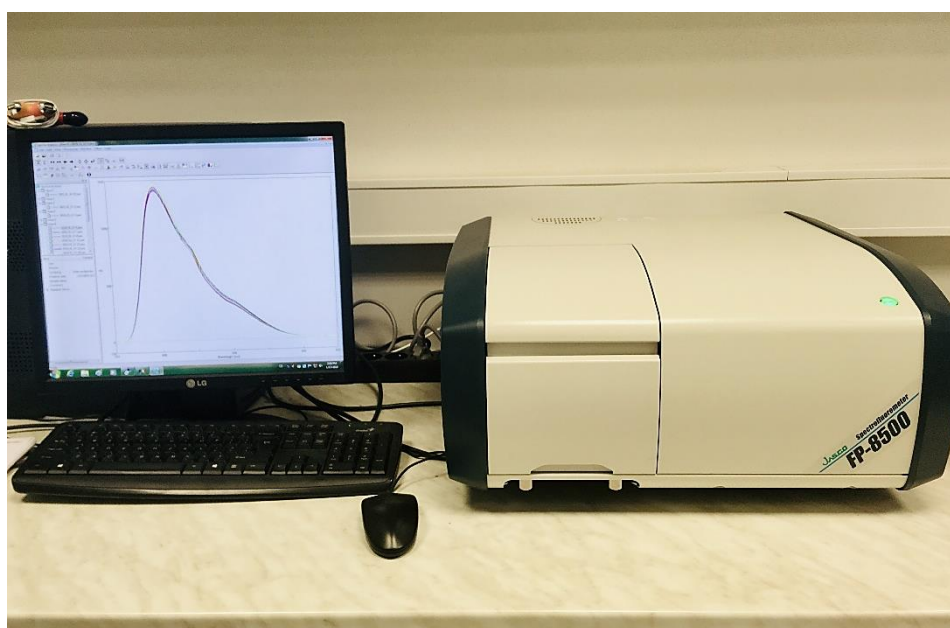
Pro experimentální účely diplomové práce byly použity mikrosomy získané z jater samců potkanů (Rat Liver Microsomes – RLM), dodané ve 250 mM sacharóзовé suspenzi. Tento produkt s identifikačním číslem R1000 vyrábí společnost Sekisui XenoTech, koncentrace 0,5 ml dodané suspenze činila 20 mg/ml proteinů.



Obrázek 23: Vzorek mikrosomální suspenze

4.1.2 Pomůcky a přístroje

V průběhu experimentů bylo použito běžné laboratorní sklo (kádinky aj.), zkumavky Eppendorf, stojany na zkumavky, automatické pipety, pH metr, analytické váhy (BOECO, Německo), přístroj na míchání a temperování ThermoMixer comfort (Eppendorf, Německo), křemenná mikrokyveta (3x3 mm) pro spektrofotometrické stanovení a spektrofotometr FP-8500 (JASCO, Japonsko) s Xe výbojkou. Pro měření, práci s daty i jejich export byl použit stolní počítač s operačním systémem Windows 7 od společnosti Microsoft. Software Spectra Measurement zprostředkoval měření jednotlivých spekter, Spectra Analysis jejich následné zobrazení s možnostmi úprav. Pro práci v laboratoři byly využity standardní ochranné pomůcky.



Obrázek 24: Spektrofotometr JASCO FP-8500

4.1.3 Standardní postup přípravy reakční směsi pro stanovení enzymové aktivity CYP uvedený výrobcem

Před samotným měřením jsou jaterní mikrosomy (např. 0,05 mg/ml) podrobeny inkubaci ve třech opakováních při 37 ± 1 °C v 200 µl reakční směsi obsahující fosfátový pufr (50 mM, pH 7,2), MgCl_2 (3 mM), EDTA (1 mM) a substrátový marker s koncentrací vhodnou pro daný konkrétní experiment. Reakce se zahajuje přidáním regeneračního systému [NADP (1 mM), glukóza-6-fosfát (5 mM), glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (1 U/ml)] a následně zastaví po 10 min přidávkem 175 µl acetonitrilu.

Regenerační systém – NADP, glukóza-6-fosfát a glukóza-6-fosfát dehydrogenáza funguje na principu převodu NADP do redukované formy NADPH pomocí enzymu, který využívá glukózu-6-fosfát jako zdroj energie. NADPH se poté v CYP zoxiduje, tím zapříčiní redukci substrátu, zde konkrétně převede 7-EC na 7-HC. Tento sled reakcí probíhá opakovaně, dokud zcela nedojde k vyčerpání fosfátového zdroje energie.

Během experimentování byly dodržovány výše uvedené pokyny pro přípravu a následnou inkubaci reakční směsí s výjimkou aplikace regeneračního systému. Místo něj byla využita rovnou redukováná forma koenzymu NADPH (0,5 mM). Mezi výhody této změny standardního postupu patřila například aplikace látky jediné oproti komplexu většího množství látek a s tím pojící se i menší pořizovací cena chemikálie. NADPH se bez ostatních komponent zpětně neregenerovalo, což představovalo sice nevýhodu, nicméně i jev očekávaný pro všechna měření.

4.1.4 Příprava fosfátového pufru (PBS)

Výrobce mikrosomů doporučuje jako reakční prostředí používat fosfátový pufr (PBS) o koncentraci 50 mM a pH 7,2. Pro přípravu 50 ml PBS požadované koncentrace bylo potřeba smíchat 14 ml 0,2 M roztoku KH_2PO_4 a 36 ml 0,2 M roztoku K_2HPO_4 . Navážky obou solí byly zváženy na analytických vahách a poté rozpuštěny ve výše uvedených objemech deionizované H_2O . Následně byly oba solné roztoky smíchány a pH PBS upraveno na hodnotu 7,2 pomocí 1 M roztoku NaOH.

4.1.5 Měření spekter jednotlivých komponent

Během enzymatické reakce dochází k přeměně substrátu v produkt s odlišnými vlastnostmi, jichž se využívá při analýze. V případě LC-MS/MS se jedná o změnu retence na chromatografické koloně a změnu molekulové hmotnosti.

Protože jsme zvolili pro charakterizaci enzymatické aktivity CYP alternativní metodu spektrofotometrie, bylo při optimalizaci podmínek nutné se zaměřit zejména na stanovení excitační a emisní vlnové délky vhodné pro měření reakčních směsí.

Reakční směs obsahuje jednak fluorescenční substrát 7-EC (a případně fluoreskující produkt 7-HC), dále pak další složky nutné pro funkci enzymu, které mohou za daných podmínek taktéž fluoreskovat (NADPH), popř. za daných podmínek fluorescenci nevykazují (MgCl_2 , EDTA, fosfáty). Fluorescence je velmi citlivá na prostředí, pásy se mohou posouvat podle složení prostředí, proto bylo jedním z prvních kroků změření spekter jednotlivých fluoreskujících komponent bez příměsí ostatních fluoreskujících látek, ale v prostředí obsahujícím všechny zbývající složky posléze potřebné pro enzymatickou reakci.

Na základě těchto výsledků bylo možné s přesností určit, jaký pás ve směsi náleží jaké sloučenině a zabránit tak následně záměnám při interpretaci dalších výstupů. Složení měřených roztoků i se zvolenými koncentracemi všech látek zobrazuje **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..** Obrázek 25 znázorňuje výsledky spektrofluorimetrického měření – excitační a emisní spektra 7-EC, 7-HC a NADPH v koncentracích plánovaných pro další experimenty.

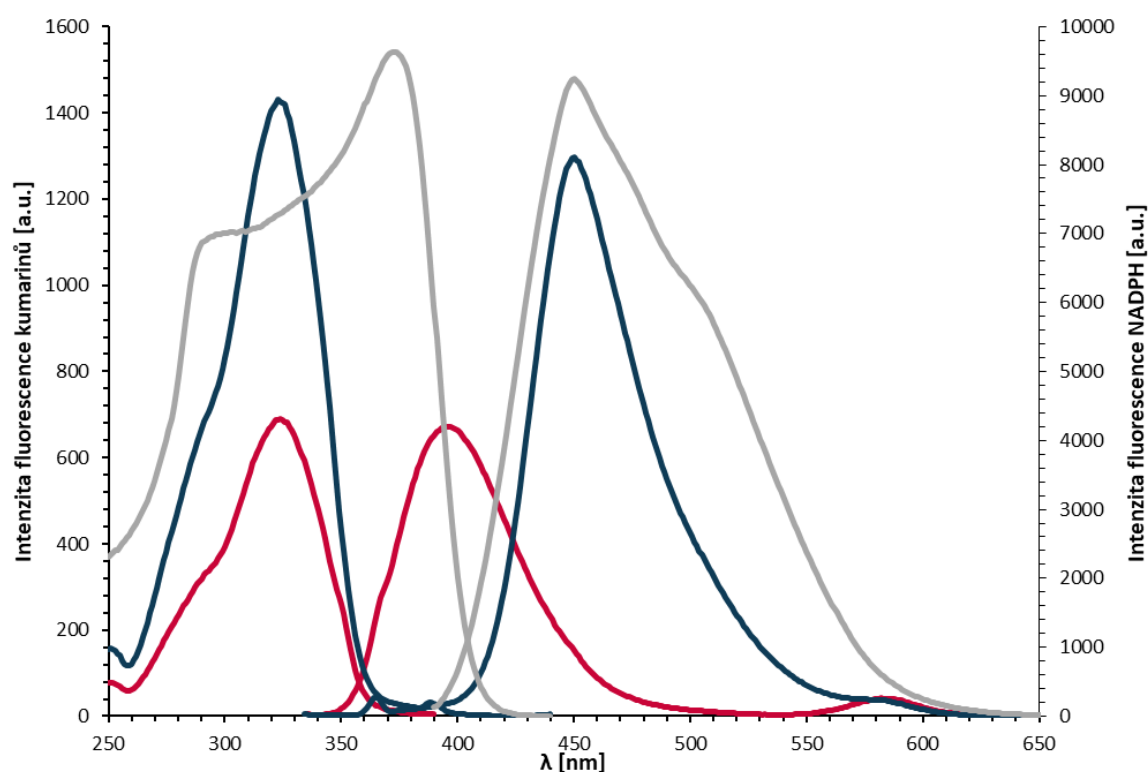
Pro měření byly připraveny 3 roztoky o objemu 200 μl s následujícím složením:

Tabulka 2: Složení roztoků pro měření spekter jednotlivých komponent

Roztok č. 1	Složení	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledné koncentrace c_2 [M]	V [μl]
Fluoreskující látka:	7-EC	10^{-5}	10^{-6}	20
Nefluoreskující látky:	PBS	$200 \cdot 10^{-3}$	$50 \cdot 10^{-3}$	50
	MgCl ₂	$3 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-3}$	20
	EDTA	10^{-2}	10^{-3}	20
	H ₂ O	–	–	90

Roztok č. 2	Složení	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledné koncentrace c_2 [M]	V [μl]
Fluoreskující látka:	7-HC	10^{-5}	10^{-6}	20
Nefluoreskující látky:	PBS	$200 \cdot 10^{-3}$	$50 \cdot 10^{-3}$	50
	MgCl ₂	$3 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-3}$	20
	EDTA	10^{-2}	10^{-3}	20
	H ₂ O	–	–	90

Roztok č. 3	Složení	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledné koncentrace c_2 [M]	V [μl]
Fluoreskující látka:	NADPH	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	20
Nefluoreskující látky:	PBS	$200 \cdot 10^{-3}$	$50 \cdot 10^{-3}$	50
	MgCl ₂	$3 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-3}$	20
	EDTA	10^{-2}	10^{-3}	20
	H ₂ O	–	–	90



Obrázek 25: Excitační a emisní spektra ● 7-EC, ● 7-HC a ● NADPH

Tabulka 3 zobrazuje excitační a emisní maxima (vlnové délky λ_{\max}) naměřená v optimu pro jednotlivé látky. Z naměřených spekter je patrné několik poznatků. Excitace obou kumarinů se jevila prakticky totožně, spektrální rozdíly s velikostí cca 50 nm byly více znát až při jevu emise. Látka 7-HC vykazovala 2x větší fluorescence než 7-EC. Fluorescence NADPH byla za daných podmínek více než 6x, resp. více než 14x intenzivnější než fluorescence 7-EC a 7-HC. Je ale také potřeba vzít v úvahu, že koncentrace NADPH je 500x větší než koncentrace jednotlivých kumarinů. U NADPH se pásy spekter projevily jako dvě identity. Tento jev byl způsoben buď vysokou nestabilitou této látky a jejím samovolným přechodem v $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$ (pás s excitačním maximem okolo 260 nm) a obráceně, a nebo například několika typy možných přechodů elektronů při excitaci a emisi. Na základě těchto naměřených spekter budou zvoleny optimální vlnové délky pro excitaci a emisi tak, aby detekce probíhala co nejcitlivěji a bez vzájemného rušení signálů [87].

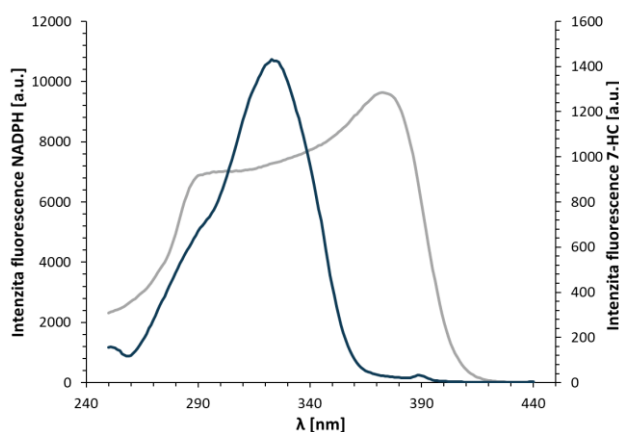
Tabulka 3: Excitační a emisní maxima pro 7-EC, 7-HC a NADPH

	Excitace – λ_{\max} [nm]	Emise – λ_{\max} [nm]
7-EC	325	400
7-HC	325	450
NADPH	380	450

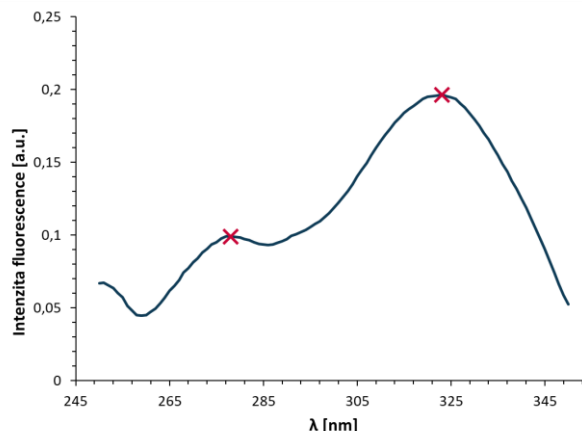
4.1.6 Stanovení potenciálních vlnových délek vhodných pro další měření

V rámci následujícího laborování bylo nezbytně nutné stanovit vhodné vlnové délky pro excitaci a emisi tak, aby signály fluoreskujících látek (7-EC, 7-HC a NADPH) ve směsi spektrálně co nejméně interferovaly. Cílem nastavení excitace a emise je signál NADPH co nejvíce potlačit a naopak produkt 7-HC excitovat a detekovat co nejvíce. Z čehož vyplývá i následná vhodnost těchto vlnových délek pro samotnou charakterizaci enzymové aktivity.

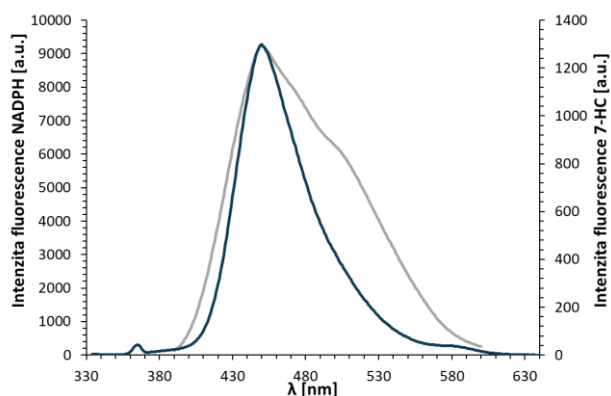
Užitečná metoda pro zjištění optimální vlnové délky je vytvoření poměru dvou spekter. Excitační a emisní spektra 7-HC byla v programu MS Excel dána do poměru se spektry NADPH (roztok č. 2 a 3 v podkapitole 4.1.5). Spektra těchto látek byla záměrně vybrána z toho důvodu, že bylo potřeba co největší hodnotu excitace/emise 7-HC podělit co nejmenší hodnotou excitace/emise NADPH tak, aby vznikla maxima. Na základě grafického znázornění těchto poměrů, viz následující obrázky, byly z globálních i lokálních maxim křivek odvozeny vhodné, potenciální vlnové délky.



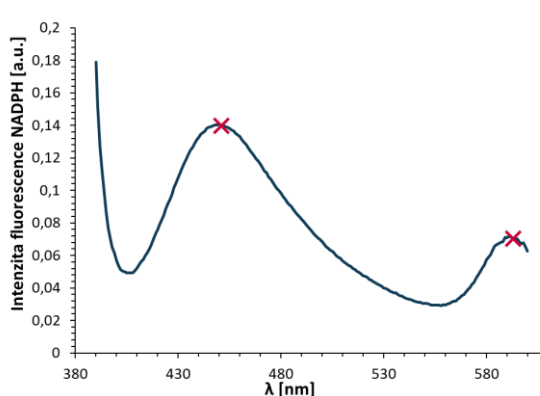
Obrázek 26: Excitační spektra ● 7-HC a ● NADPH



Obrázek 27: Poměr excitačních spekter 7-HC/NADPH



Obrázek 28: Emisní spektra ● 7-HC a ● NADPH



Obrázek 29: Poměr emisních spekter 7-HC/NADPH

Následující tabulka zobrazuje přehled potenciálních vlnových délek, vhodných pro další spektrofotometrická měření směsí. Excitační vlnové délky vhodné pro měření emise (λ_{ex}) byly odvozeny z lokálního a globálního maxima excitační poměrové křivky, naopak emisní vlnové délky (λ_{em}) vhodné pro měření excitace byly stanoveny z maxim emisní poměrové křivky.

Tabulka 4: Potenciální vlnové délky λ_{ex} a λ_{em} vhodné pro další měření směsí

Excitace – λ_{ex} [nm]	Emise – λ_{em} [nm]
278	450
323	590

4.1.7 Stanovení jedné optimální vlnové délky pro charakterizaci enzymové aktivity

Z poměru excitačních spekter 7-HC a NADPH byly stanoveny dvě emisní vlnové délky potenciálně vhodné pro další experimenty – 278 a 323 nm. Motivací bylo stanovit, která z těchto dvou vlnových délek se jeví jako relevantnější a při které by charakterizace enzymatické aktivity probíhala s větší citlivostí. Rovněž také ověřit, jestli vlnová stanovená z globálního maxima křivky je reálně vhodnější než vlnová délka stanovená z maxima lokálního.

Následovalo spektrofotometrické proměření sady roztoků o objemu 200 μ l, různého složení: 7-EC směs (i s NADPH), 7-EC ve vodě, 7-HC směs (i s NADPH), 7-HC ve vodě, NADPH směs (bez kumarinů) a NADPH ve vodě. Pro měření byly použity výše uvedené, zjištěné vlnové délky.

Tabulka 5 zobrazuje podrobnější údaje o složení jednotlivých směsí, následující grafy prezentují výsledky spektrofotometrického měření, naměřená emisní spektra daných roztoků.

Tabulka 5: Složení roztoků pro měření spekter vhodných ke stanovení optimálních vlnových délek

7-EC ve vodě	Složení	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledná koncentrace c_2 [M]	V [μ l]
	7-EC	10^{-5}	10^{-6}	20
	H ₂ O	–	–	180

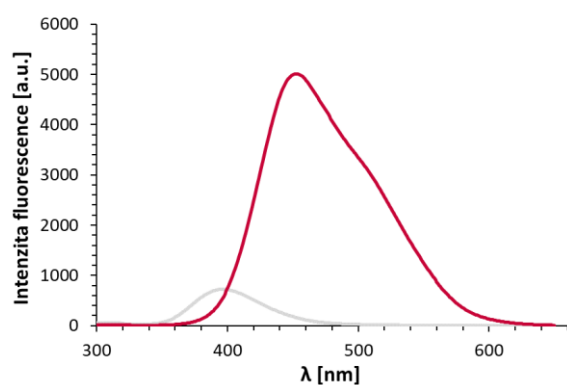
7-EC směs	Složení	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledná koncentrace c_2 [M]	V [μ l]
	7-EC	10^{-5}	10^{-6}	20
	NADPH	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	20
	PBS	$200 \cdot 10^{-3}$	$50 \cdot 10^{-3}$	50
	MgCl ₂	$3 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-3}$	20
	EDTA	10^{-2}	10^{-3}	20
	H ₂ O	–	–	70

7-HC ve vodě	Složení	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledná koncentrace c_2 [M]	V [μl]
	7-HC	10^{-5}	10^{-6}	20
	H ₂ O	–	–	180

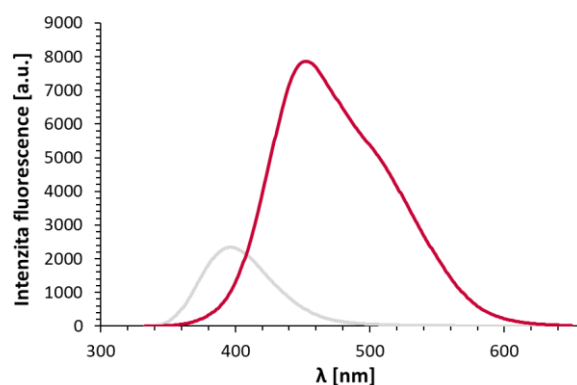
7-HC směs	Složení	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledná koncentrace c_2 [M]	V [μl]
	7-HC	10^{-5}	10^{-6}	20
	NADPH	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	20
	PBS	$200 \cdot 10^{-3}$	$50 \cdot 10^{-3}$	50
	MgCl ₂	$3 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-3}$	20
	EDTA	10^{-2}	10^{-3}	20
	H ₂ O	–	–	70

NADPH ve vodě	Složení	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledná koncentrace c_2 [M]	V [μl]
	NADPH	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	20
	H ₂ O	–	–	180

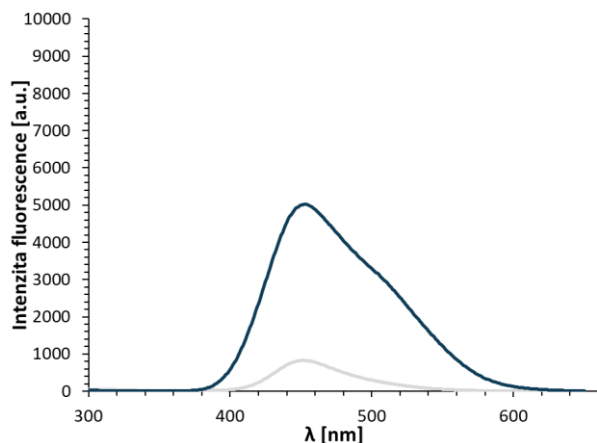
NADPH směs	Složení	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledná koncentrace c_2 [M]	V [μl]
	NADPH	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	20
	PBS	$200 \cdot 10^{-3}$	$50 \cdot 10^{-3}$	50
	MgCl ₂	$3 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-3}$	20
	EDTA	10^{-2}	10^{-3}	20
	H ₂ O	–	–	90



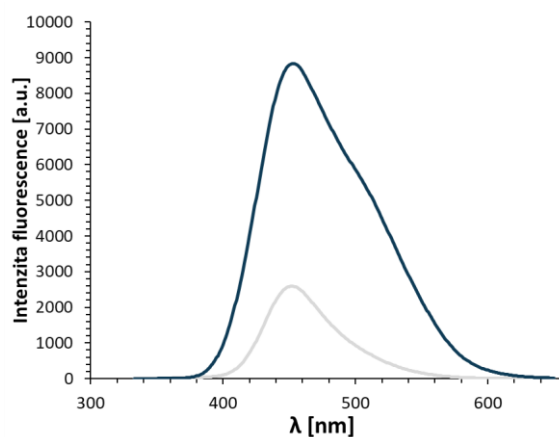
Obrázek 30: Emisní spektra ● 7-EC směs a
● 7-EC voda (exc. 278 nm)



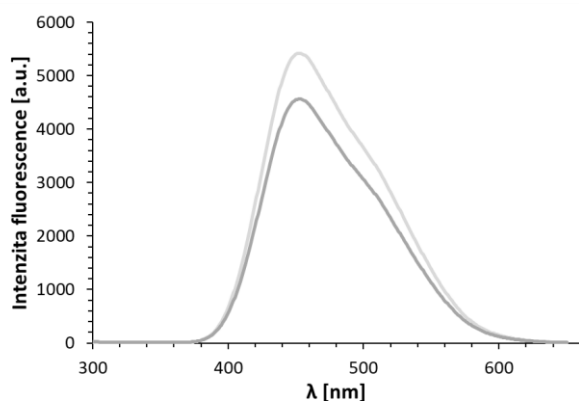
Obrázek 31: Emisní spektra ● 7-EC směs a
● 7-EC voda (exc. 323 nm)



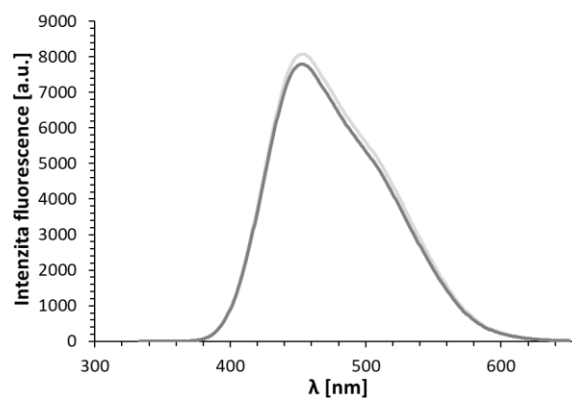
Obrázek 32: Emisní spektra ● 7-HC směs a
● 7-HC voda (exc. 278 nm)



Obrázek 33: Emisní spektra ● 7-HC směs a
● 7-HC voda (exc. 323 nm)



Obrázek 34: Emisní spektra ● NADPH směs a
● NADPH voda (exc. 278 nm)



Obrázek 35: Emisní spektra ● NADPH směs a
● NADPH voda (exc. 323 nm)

Výstupy měření potvrdily větší vhodnost vlnové délky 323 nm, jakožto globálního maxima excitační poměrové křivky, pro následující měření s přítomností enzymů. V případě kumarinů probíhala detekce signálu citlivěji, pásy byly intenzivnější. Pás 7-HC ve směsi byl při vlnové délce 323 nm v rozmezí 400-600 nm intenzivnější i užší v porovnání s pásem odpovídajícím vlnové délce 278 nm, tzn. NADPH ve směsi vykazovalo pokles intenzity fluorescence nejen oproti NADPH ve vodě, ale také i ve srovnání s intenzitou 7-HC ve směsi. Stanovená, optimální vlnová délka 323 nm byla dále přenesena na experimenty pojící se s kalibrační závislostí a charakterizací enzymatické aktivity.

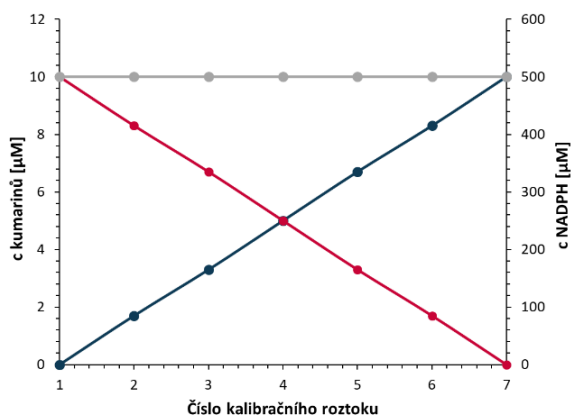
4.1.8 Měření kalibrační závislosti konvenčním přístupem

Kalibrací je zajištěna jednotnost a správnost měření, v případě této diplomové práce charakterizace enzymatické aktivity. Pro měření kalibrační závislosti bylo připraveno 7 roztoků o objemu 200 μl s následujícím složením:

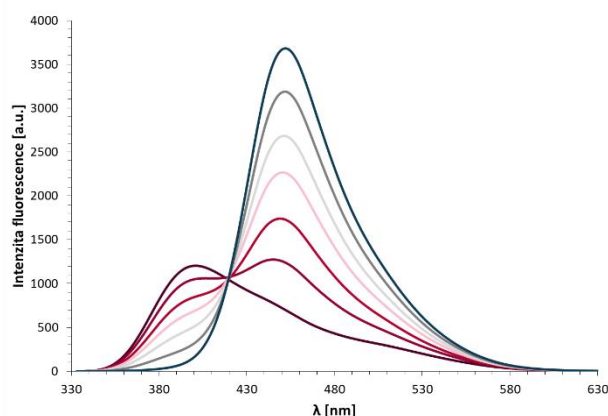
Tabulka 6: Konstantní složky roztoků pro měření kalibrační závislosti

Konstantní složky	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledná koncentrace c_2 [M]	V [μl]
NADPH	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	20
PBS	$200 \cdot 10^{-3}$	$50 \cdot 10^{-3}$	50
MgCl_2	$3 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-3}$	20
EDTA	10^{-2}	10^{-3}	20
H_2O	—	—	60

Každý roztok obsahoval i oba kumariny o různém koncentračním složení tak, aby v průběhu měření intenzita fluorescence 7-EC klesala, u 7-HC naopak stoupala, viz obrázek 36 a 37. Detailní informace o složení kumarinů v jednotlivých roztocích zobrazuje tabulka 7. Všechny roztoky byly měřeny ve třech sériích při optimální excitační vlnové délce 323 nm, data byla poté průměrována.



Obrázek 36: Grafické znázornění poklesu koncentrace ● 7-EC a nárůstu ● 7-HC v průběhu kalibračního měření; předpoklad konst. koncentrace ● NADPH



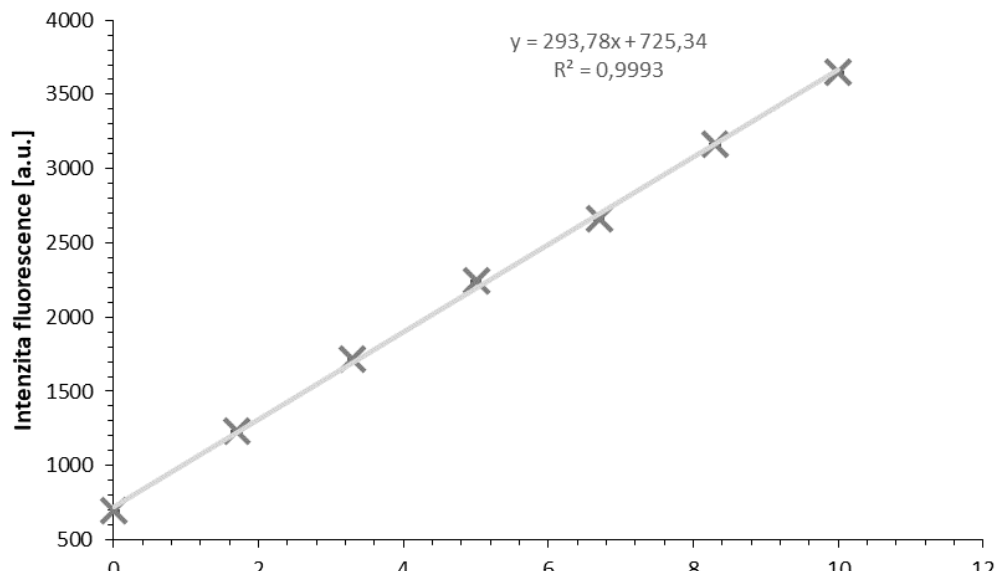
Obrázek 37: Výstup kalibračního měření zobrazující izozbestický bod

Tabulka 7: Složení kumarinů v jednotlivých roztocích pro měření kalibrační závislosti

7-EC	Číslo roztoku	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledná koncentrace c_2 [M]	V [μl]
	1	$6,67 \cdot 10^{-5}$	$10,0 \cdot 10^{-6}$	30
	2		$8,3 \cdot 10^{-6}$	25
	3		$6,7 \cdot 10^{-6}$	20
	4		$5,0 \cdot 10^{-6}$	15
	5		$3,3 \cdot 10^{-6}$	10
	6		$1,7 \cdot 10^{-6}$	5
	7		0	0

7-HC	Číslo roztoku	Koncentrace zásobních roztoků c_1 [M]	Výsledná koncentrace c_2 [M]	V [μl]
	1	$6,67 \cdot 10^{-5}$	0	0
	2		$1,7 \cdot 10^{-6}$	5
	3		$3,3 \cdot 10^{-6}$	10
	4		$5,0 \cdot 10^{-6}$	15
	5		$6,7 \cdot 10^{-6}$	20
	6		$8,3 \cdot 10^{-6}$	25
	7		$10,0 \cdot 10^{-6}$	30

Ze spekter každého roztoku bylo vybráno 10 hodnot v okolí 450 nm, odpovídajících intenzitám emisního maxima 7-HC. Na základě průměrů těchto hodnot byla v Excelu sestavena následující kalibrační křivka.



Obrázek 38: Kalibrační přímka 7-HC v přítomnosti 7-EC a NADPH;

Poznámka: Chybové úsečky se v grafu jeví nepatrně kvůli zanedbatelným hodnotám směrodatných odchylek

Na vynesené kalibrační přímce neležely žádné odlehlé body, její dostatečná přesnost byla prokázána mírou spolehlivosti $R^2 = 0,993$. Hodnoty směrodatných odchylek se v grafu jeví jen zanedbatelně. Z těchto důvodů byly následující experimenty posunuty dále za účelem sledování aktivity enzymů.

4.1.9 Měření aktivity konvenčním přístupem

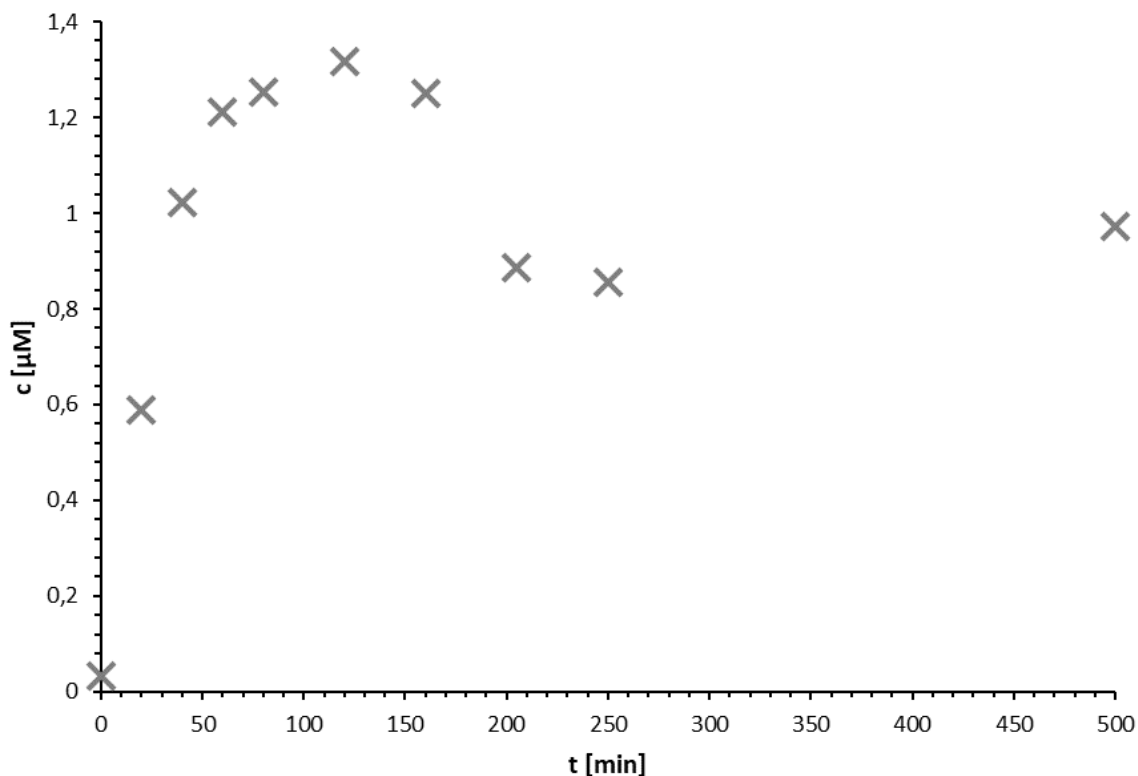
Přídavkem mikrosomální suspenze do reakční směsi započala řada měření, jejichž motivací bylo sledování přeměny substrátu 7-EC v produkt 7-HC, zprostředkované CYP. Předpokladem byla i konstantní hodnota koncentrace NADPH v průběhu experimentů.

Do reakční směsi, která je detailně i s koncentracemi popsána v tabulce 8, bylo těsně před začátkem měření (čas t_0) přidáno NADPH, které zahájilo enzymatickou reakci. Poté byly všechny reaktanty ve zkumavce protřepány, vzápětí bylo odebráno pipetou 200 μl směsi. Následovalo přenesení vzorku do mikrokryvety a změření emise s nastavenou vlnovou délkou $\lambda_{\text{ex}}=323 \text{ nm}$. Reakce probíhala za neustálého míchání v temperované třepačce při teplotě 37°C . Měření bylo zpočátku opakováno každých 20 min, interval byl postupně prodlužován.

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro sledování aktivity enzymů

Reakční směs	Složení	Výsledná koncentrace c [M]; Poznámka: výjimka $[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$ pro RLM	V [μl]
	7-EC	10^{-5}	200
	PBS	$50 \cdot 10^{-3}$	500
	EDTA	10^{-3}	200
	MgCl_2	$3 \cdot 10^{-3}$	200
	H_2O	—	670
	RLM	20	30
	NADPH	$5 \cdot 10^{-4}$	200

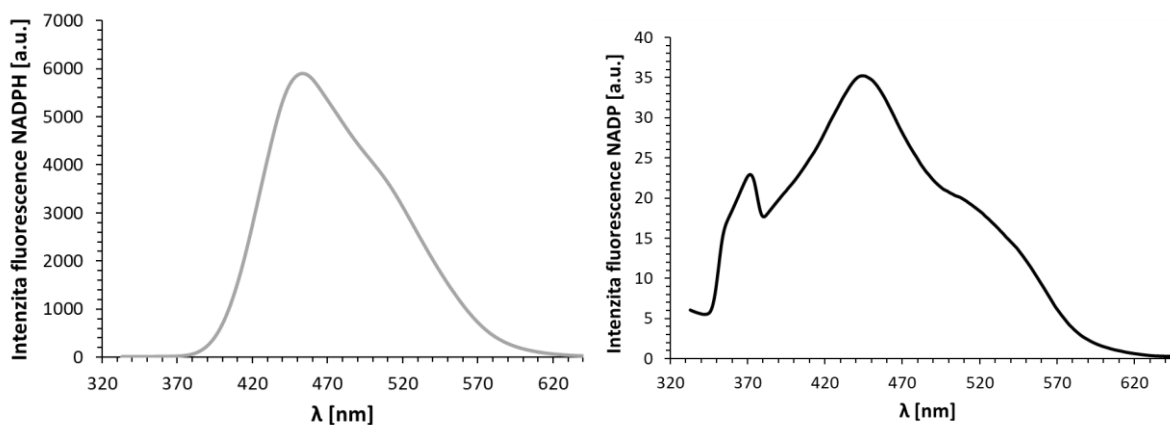
Z naměřených spekter bylo pro každý čas vybráno 10 hodnot intenzit z oblasti odpovídající emisnímu maximu 7-HC. Tyto hodnoty byly následně zprůměrovány a dosazeny do rovnice kalibrační přímky $y = 293,78x + 725,34$. Tímto způsobem byly spočteny koncentrace 7-HC v reakční směsi pro každý měřený čas. Časovou závislost koncentrací 7-HC v průběhu celé reakce zobrazuje následující graf.



Obrázek 39: Závislost koncentrace 7-HC na čase v průběhu enzymatické reakce

Růst koncentrací produktu 7-HC probíhal od zahájení reakce do času $t_5 = 120 \text{ min}$. Poté následoval pokles, čímž se nevyplnil prvotní předpoklad konstantní koncentrace 7-HC po dovršení maxima v průběhu měření.

Tento jev byl v přítomnosti enzymů způsobený neustálým přechodem NADPH v látku $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$ [87]. Negativní vliv na měření, způsobený kolísáním fluorescence NADPH při přechodu v NADP, demonstruje porovnání intenzit fluorescence těchto látek, viz obrázek 40. Spektrum NADP vykazovalo velmi nízké hodnoty intenzity fluorescence, což odpovídá i zeslabení signálu v časové závislosti na obrázku 39.



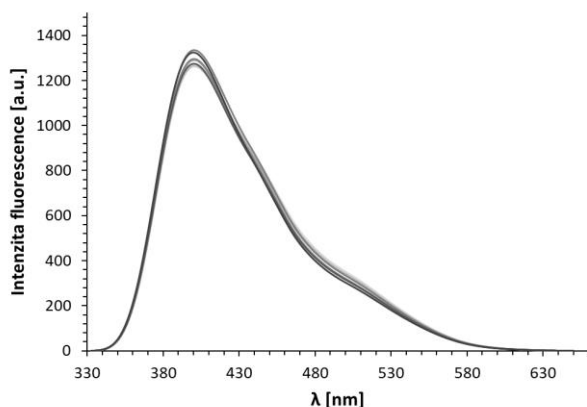
Obrázek 40: Porovnání emisních spekter NADPH a NADP

Protože emisní maximum spektra NADPH odpovídá i maximu produktu 7-HC (450 nm), není reálně možné sledovat přírůstek produktu ani vyhodnocovat aktivitu enzymatické reakce standardní konvenční metodou (tj. dosazováním intenzit do regresní rovnice kalibrační přímky). Tento fakt bylo potřeba zohlednit v rámci jiné vyhodnocovací metody. Jako řešení bylo navrženo provedení regresní analýzy pomocí metody NNLS (non-negative least squares) s funkcí řešitele.

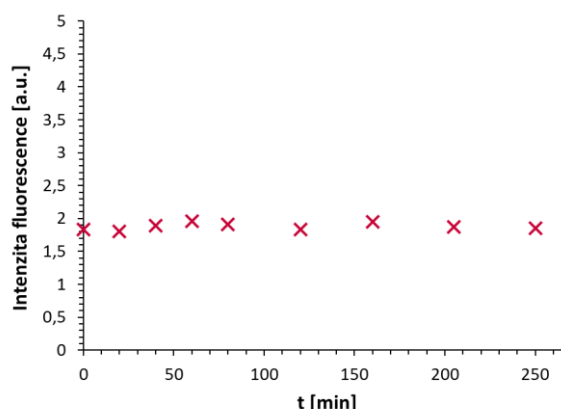
Vyhodnocováním naměřených dat pomocí NNLS se detailně zabývá kapitola 4.1.11 a 4.1.11.

4.1.10 Ověření časové stability systému a měření fluktuace lampy

Před dalším vyhodnocováním bylo také nutné ověřit časovou stabilitu systému bez přítomnosti enzymů, tzv. blank. Reakční směs byla proměřována toutéž vlnovou délkou ve stejných časech i se stejným složením, jaké zobrazuje tabulka 8 v předchozí podkapitole (s výjimkou přidavku mikrosomů). Cílem měření blanku bylo dokázat, že koncentrační změny substrátu a produktu v průběhu měření nejsou způsobeny jinými faktory než enzymatickými, tzn. zprostředkovanými CYP.



Obrázek 41: Výstup měření blanku prokazující stabilitu systému bez přidavku mikrosomů



Obrázek 42: Konstantní intenzita fluorescence reakční směsi v čase

Zároveň byla sledována fluktuace lampy měřením interního standardu, tzv. kalibrantu, kterým byl 10^{-5} M roztok 7-EC. Xenonová výbojka byla půl hodiny před tím než započalo měření ponechána stabilizaci, až poté proběhlo měření emisí standardu. V průběhu experimentu byly zachovány totožné podmínky i nastavená excitační vlnová délka. Pro vyhodnocení fluktuace, byly hodnoty intenzit všech emisí zprůměrovány. První emisní průměr byl znormalizován (100%), zbylé průměry byly touto hodnotou poděleny. Výsledky zobrazuje následující tabulka.

Tabulka 9: Výsledky měření fluktuace Xe výbojky

Číslo měření kalibrantu	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fluktuace [%]	100,0	98,9	97,7	96,6	96,7	94,9	92,9	96,6	94,2

Graficky znázorněná časová závislost na obrázku 42 prokázala stabilitu systému za daných podmínek bez nutnosti korelace dat. Byly vyvráceny ostatní faktory vlivu na přeměnu substrátu v produkt, jako např. zahřívání, samovolný rozklad substrátu či oxidace.

Výsledky testování stability lampy zobrazují jen nepatrnou proměnlivost fluktuace během měření v rámci intervalu $\pm 5 \%$.

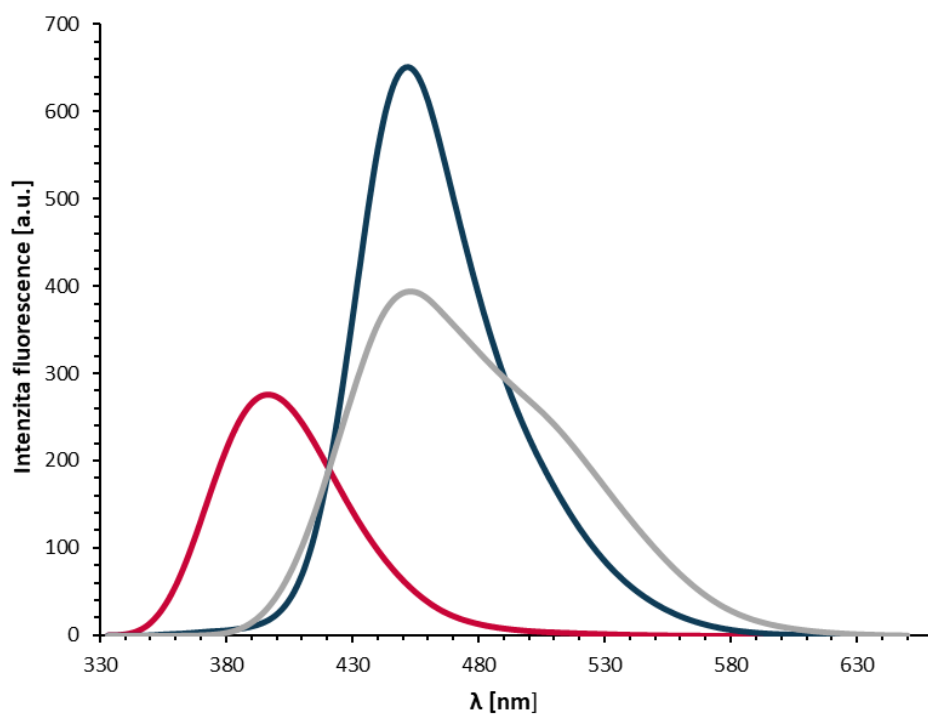
4.1.11 Vyhodnocení aktivity metodou NNLS

V kapitole 4.1.9 bylo prokázáno i odůvodněno nestabilní chování a s tím pojící se proměnlivost spekter NADPH v průběhu enzymatické reakce. Jelikož se látka NADPH vyznačuje totožnou vlnovou délkou emisního maxima jako produkt 7-HC, způsobila negativní vliv na celé měření a prakticky i nemožnost vyhodnocování konvenční metodou. Z toho důvodu bylo jako řešení tohoto problému navrženo využití metody NNLS (non-negative least squares).

Metoda NNLS zprostředkovává v excelu regresní analýzu dat pomocí doplňku s názvem Řešitel. Pro Řešitele není rozklad NADPH problémem, protože funguje na principu prokládání (tzv. fitování) spekter na základě metody nejmenších čtverců. Dokáže nafitovat intenzity vzorových spekter jednotlivých komponent do experimentálních, které byly naměřeny v rámci všech časů sledování reakční směsi v průběhu enzymatické reakce.

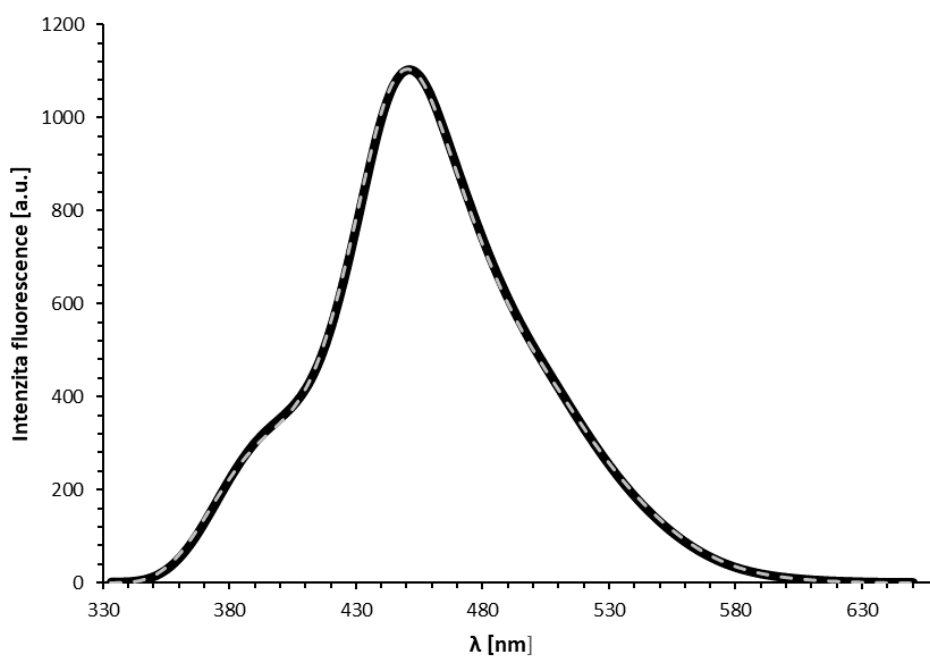
Prakticky je potřeba Řešiteli připravit v Excelu tabulku obsahující data všech vzorových spekter i spektra naměřeného v průběhu reakce. Dále počítá se sumou reziduálů, což je hodnota součtu všech rozdílů, mezi daty spektra vypočteného a experimentálně naměřeného, umocněných na druhou. Pro sumu reziduálů byla vybrána data z oblasti 350-580 nm. Řešitel byl nastavený tak, aby sledoval buňku sumy reziduálů a minimalizoval ji s přesností 10^{-14} . Tímto bylo dosaženo výpočtu regresních koeficientů, pomocí kterých bylo možné přesně určit, kolikrát byla látka v daném čase zastoupena v naměřeném spektru směsi. Vynásobením těchto koeficientů původní koncentrací sledované látky lze poté snadno získat hodnotu koncentrace dané látky v jakémkoli čase během enzymaticky katalyzované reakce (vypočtená fitovaná spektra).

Prokládání spekter je umožněno díky tomu, že je fluorescence aditivní děj a v určitých koncentracích se v součtu sčítají spektra jednotlivých složek. Následující grafy znázorňují příklad fitování součtu 3 vypočtených spekter do spektra experimentálního v konkr. čase enzymatické reakce $t_4 = 80 \text{ min.}$



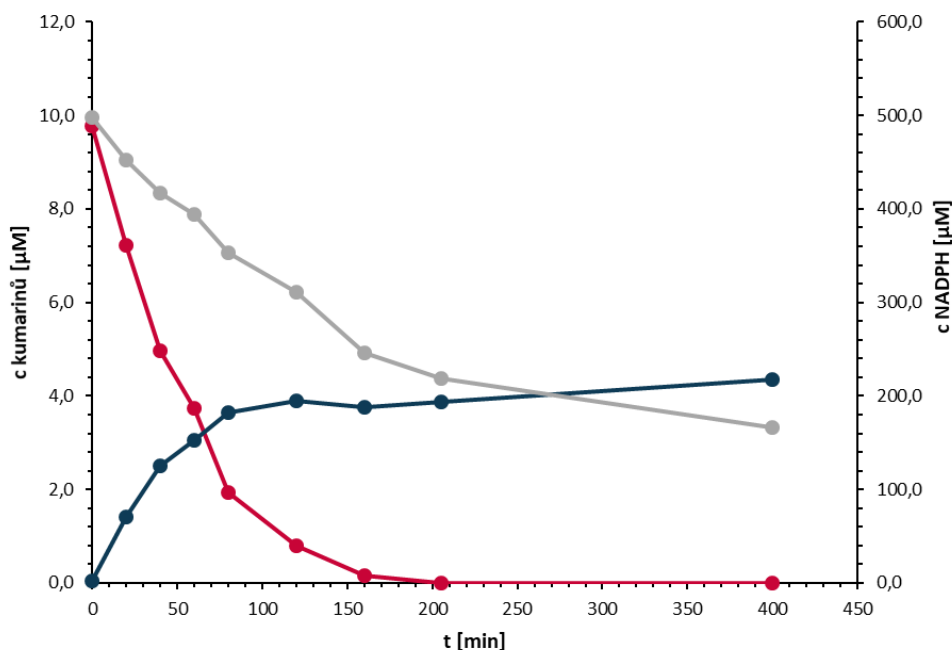
Obrázek 43: Emisní spektra ● 7-EC, ● 7-HC a ● NADPH

Poznámka: Spektra byla vypočtena vynásobením dat původních vzorových spekter regresními koeficienty, vyhodnocenými Řešitelem



Obrázek 44: — Experimentální spektrum směsi v čase t_4
 - - Fitující spektrum (součet)

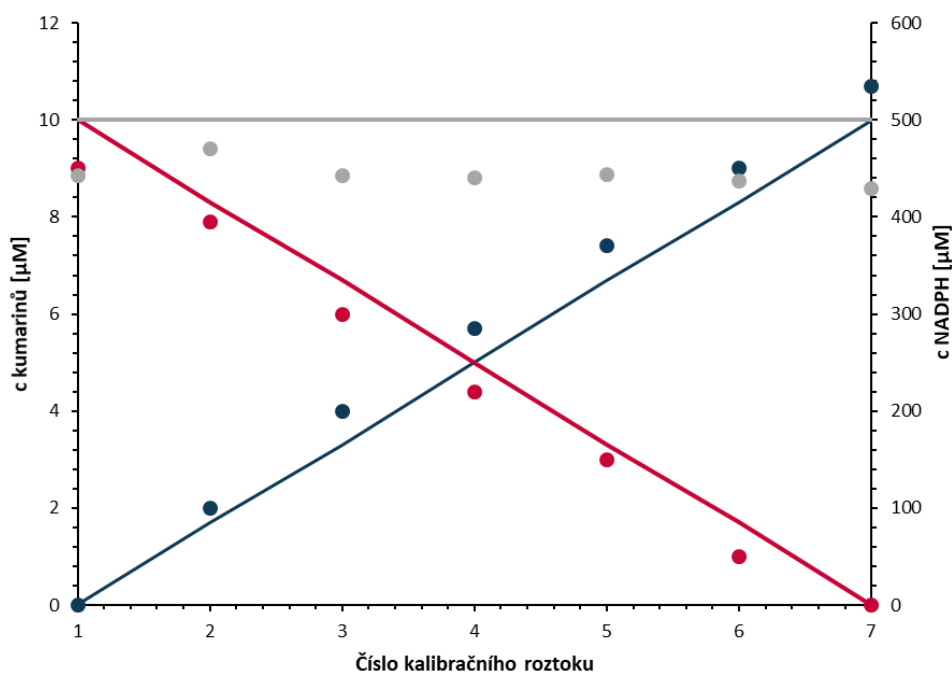
Následující graf byl sestaven na základě dopočítaných koncentrací všech složek.



Obrázek 45: Časová závislost enzymatické aktivity vyhodnocená pomocí Řešitele; ● 7-EC, ● 7-HC a ● NADPH

4.1.12 Vyhodnocení kalibrační závislosti metodou NNLS

Pro ověření funkčnosti i kvality vyhodnocení časové závislosti enzymatické aktivity pomocí Řešitele, byla metoda NNLS aplikována také na spektra získaná při měření kalibrační závislosti. Kalibrační přímkové sestrojené z koncentrací teoretických i vypočítaných pomocí regresních koeficientů zobrazuje obrázek 46.



Obrázek 46: Kalibrační křivky vyhodnocené pomocí Řešitele: ● 7-EC, ● 7-HC a ● NADPH
Kalibrační křivky teoretické: — 7-EC, — 7-HC a — NADPH

Grafické znázornění kalibračních přímek vynesných na základě dat získaných pomocí Řešitele, potvrzuje vhodnost aplikace tohoto nekonvenčního přístupu pro modelový systém 7-EC/7-HC ke sledování enzymatické aktivity CYP. Koncentrace 7-HC za přítomnosti 7-EC i NADPH stoupala, naopak substrát 7-EC v průběhu reakce ubýval. Sledováním enzymatické aktivity byla potvrzena funkčnost mikrosomů, výsledky jsou pro vytyčené cíle této diplomové práce dostačující. Metoda regresní analýzy NNLS vyhodnocuje přijatelně a je možné ji v budoucnu využít spolu s optimalizovanými podmínkami (vlnové délky, koncentrace, nastavení přístroje) v rámci dalšího výzkumu spojeného s biotransformací i konkrétních léčiv.

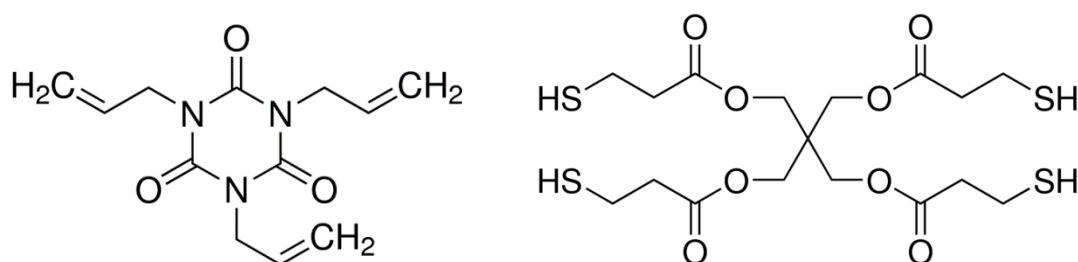
4.2 Mikrofluidická část

Další motivací diplomové práce bylo optimalizovat metodu fabrikace mikrofluidických čipů z materiálu OSTE technikou "soft" litografie. Následně otestovat funkčnost vyrobených čipů a zhodnotit propojení optimalizovaných podmínek enzymatické části experimentální práce s výsledky části mikrofluidické. Poté provést diskuzi vyhlídek dalších experimentů, zabývajících se sledováním modelového systému i biotransformace konkrétních léčiv uvnitř mikrofluidických kanálků.

V kapitole 2.1.4.1 teoretické části je princip metody "soft" litografie obecně popsán. Je nutné podotknout, že klasický postup – prvotní fabrikace masteru s následným odlitím čipu, byl upraven na postup víceetapový. Nejprve byla pomocí fotorezistu vyrobena předloha, na které design kanálků vystupoval nad rovinu podkladu a na ni bylo následně odlito PDMS do formy, která vymezovala výšku materiálu. Tím vznikl vlastně čip s kanálkem, ale z materiálu PDMS, jehož výhoda je, že lze snadno upravit ořezáním na požadované rozměry a vytvořit v něm vstupy. Tyto PDMS „čipy“ sloužily jako předloha pro další odlévání PDMS. Až tímto krokem vznikla forma pro odlévání OSTE čipů.

4.2.1 Použité chemikálie

Během laborování byly použity následující chemikálie: negativní fotorezist SU-8 3025 s vyvíječem (MikroChem, Japonsko), PDMS Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit (Dow Corning, Michigan, USA), trichloro(1H,1H,2H,2H-tridekafluoro-n-oktyl)silan (Tokyo Chemical Industry, Japonsko), 1,3,5-triallyl -1,3,5-triazin-2,4,6,(1H,3H,5H)-trion (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), pentaerythritol tetrakis(3-merkaptopropionát) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), OSTEMER 322 Crystal Clear (Mercene Labs AB, Švédsko), fotoiniciátor Irgacure TPO-L, 2, 4, 6-trimethylbenzoylphenyl phosphinate (BASF Corporation, USA), pyronin B (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a izopropanol (PENTA, ČR).



Obrázek 47: Monomery thioleů: 1,3,5-triallyl -1,3,5-triazin-2,4,6,(1H,3H,5H)-trion a pentaerythritol tetrakis(3-merkaptopropionát) [88]

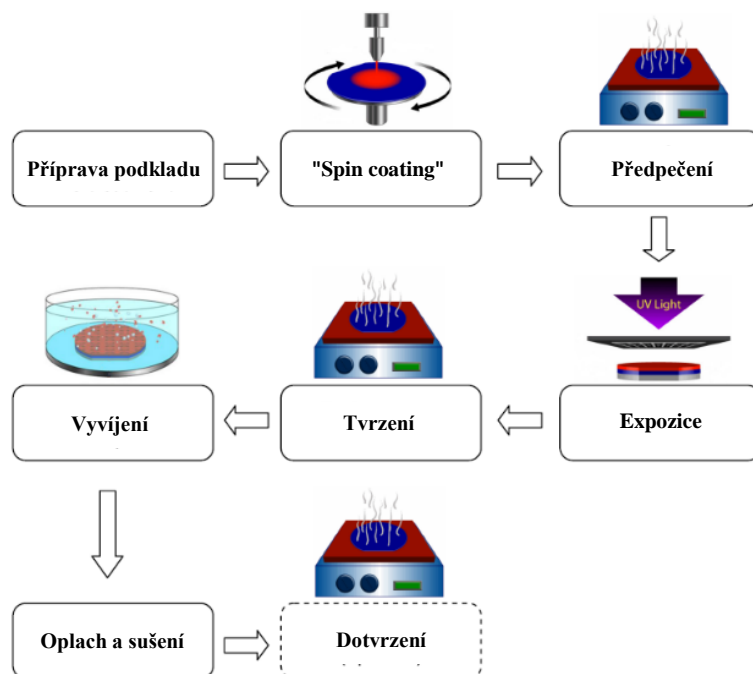
4.2.2 Pomůcky a přístroje

Z běžných laboratorních pomůcek byly použity zejména plastové Petriho misky a Pasteurovy pipety. Také podložní i mikroskopová sklíčka, fotomasky (vyrobeny na zakázku na fotografickém emulzním filmu tloušťky 177 μm s jemným zrnem; Micro Lithography Services Limited, Velká Británie), žiletky, řezací podložka, kruhový skalpel (tzv. biopsy punch), alobal, magnety, netkané utěrky, PMMA fólie, pinzeta, plastové tyčinky, špičky, automatické pipety, exsikátory, kovový držák na čipy, komerční konektory pro připojení kapiláry a křemíková kapilára s polyimidovým povlakem.

Dále byly využity následující přístroje: analytické váhy (Kern, ČR), membránová vývěva (KNF, Francie), přístroj na nanášení tenkých vrstev, "spin coater" typ WS-400B-6NPP/LITE (Laurel Technologies, USA), topné desky HP-20 a PZ-288-2 (Witeg a Präzitherm, Německo), UV lampa Star LED 385 nm (EMOS, ČR), plazmový generátor ZEPTO (Diener Electronic, Německo), vortex mixer Wizard s IR senzorem (VELP, Itálie) a UV expoziční komora CL-1000 s lampami pro 365 nm (UVP, Německo).

Při procesu fabrikace masterů a OSTE čipů se pracovalo v čistých laboratořích, kde je z důvodu minimalizace koncentrace prachových částic vháněn přefiltrovaný vzduch. Manipulaci s fotocitlivými látkami (SU-8 nebo fotoiniciační činidlo TPO-L) bylo nutné provádět v prostorách laboratoře s redukováným světlem. V průběhu experimentování byly využity standardní ochranné pomůcky, navíc i vlásenka.

4.2.3 Fotolitografická výroba předlohy pro master



Obrázek 48: Schéma výroby SU-8 předlohy [89]

- **Příprava podkladu**

Skleněné podklady (5x5 cm) by měly být pro dosažení nejlepších výsledků, ještě před zahájením experimentů, očištěny pomocí 30% H_2O_2 s koncentrovanou H_2SO_4 v poměru 1:3 (V/V). Následně je vhodné je uskladňovat v deionizované vodě.

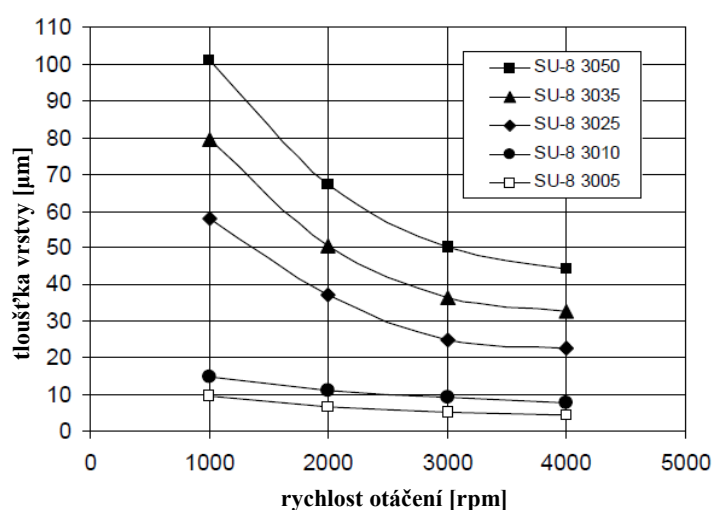
- **Nanesení tenké vrstvy** negativního fotorezistu SU-8 3025 – "spin coating"

Těsně před nanášením bylo sklíčko vyjmuto z vody, očištěno izopropanolem (IP), osušeno a položeno po dobu 5 min na topnou desku s teplotou 65 °C. To proto, aby se vypařilo přebytečné rozpouštědlo.

Poté bylo sklíčko vakuem přisáto k rotačnímu nástavci "spin coateru". Na nástavec bylo nanášeno takové množství fotorezistu SU-8, aby se na skle rovnoměrně rozprostřel v ploše vyznačené kruhové rysky. "Spin coater" byl poté uzavřen a uveden do chodu s nastavením 3000 rpm. Tímto počtem otáček bylo docíleno vytvoření 25 µm tenké vrstvy fotorezistu. Závislost tloušťky vrstvy na počtu otáček, uvedenou výrobcem, zobrazuje obrázek 49.



Obrázek 49: "Spin coater", typ: WS-400B-6NPP/LITE, Laurel Technologies



Obrázek 50: Závislost tloušťky vrstvy na otáčkách pro fotorezisty SU-8 3000 [90]

- **Předpečení - "pre-bake"**

Následovalo pečení substrátu s deponovanou vrstvou: 95 °C, 13 min.

Tato doba byla optimalizovaná na základě intervalu, doporučeného výrobcem fotorezistu, viz tabulka 10. "Pre-bake" je nutný pro odpaření rozpouštědel z tenké vrstvy směsi SU-8. Další kroky je možné provádět, až po vychlazení na laboratorní teplotu (LT).

Tabulka 10: Přehled časových intervalů vhodných pro "pre-bake" dané tloušťky vrstvy

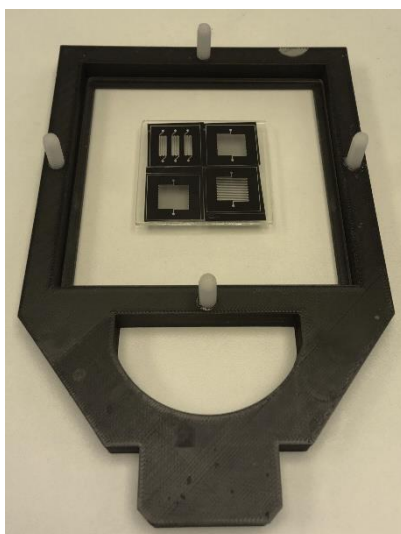
Tloušťka vrstvy [µm]	Čas pro 95°C [min]
4-10	2-3
8-15	5-10
20-50	10-15
30-80	10-30
40-100	15-45

- **Expozice**

Ještě předtím než byl tenkovrstvý substrát uzavřen mezi dvěma sklíčky do expozičního rámečku, byly na jeho povrchu rozmístěny 4 fotomasky (2x2 cm), viz obrázek 50. Poté byl celý systém vystaven UV osvětlení o vlnové délce 385 nm.

Negativní fotorezist se vyznačuje tím, že zpolymeruje v místě, kde byl osvětlen. Proto se v tomto případě používají masky, které mají kromě míst s požadovanými vzory pro kanálky celý povrch zakrytý. Použité masky obsahovaly kanálky s šířkou: 200 μm (2x), 400 μm a 500 μm . Jejich detailnější design prezentuje příloha 1.

Expoziční čas, byl spočtený podle pokynů výrobce. Pro dostupnou lampu s výkonem 250 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, osvěčující 25 μm tenkou vrstvu, byl optimalizovaný na 25 min.



Obrázek 51: Expoziční rámeček s tenkovrstvým substrátem, pokrytý fotomaskami

- **Tvrzení – PEB (post-exposure bake)**

Substrát, zbavený rámečku i masek byl následně tvrzen na topné desce ve dvou krocích: 65 °C, 1 min a hned poté 95°C po 3,5 min.

Během prvních minut polymerace bylo možné pozorovat první vystupující kanálky.

- **Vyvíjení**

Během dalšího kroku se ze substrátu vyplavuje veškerý neopolymerovaný fotorezist. Pro SU-8 se používá komerční vyvíječ, složený ze směsi organických rozpouštědel.

Substrát, umístěný do Petriho misky, byl zalit vyvíječem tak, aby se docílilo jeho kompletního ponoření. Petriho miska byla následně po dobu 4,5 min promíchávána, během této doby docházelo k finálnímu vystupování kanálků – předlohy pro master.

- **Opláchnutí a sušení**

Po vyvíjení byla předloha co nejrychleji opláchnuta IP a následně vysušena vzduchem.

- **Dotvrzení - "hard bake"**

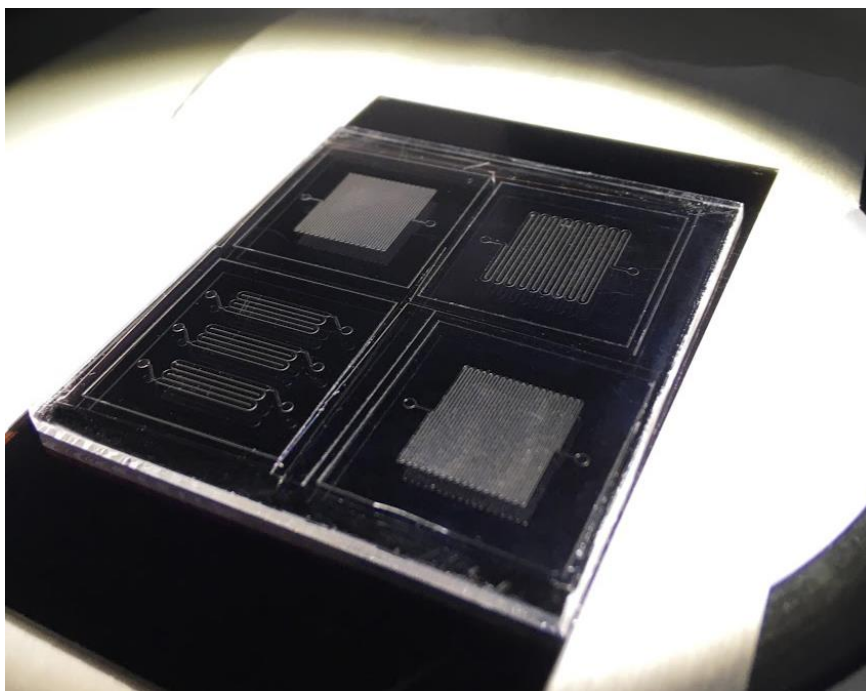
Následoval dotvrzovací krok, který je doporučovaný pro zlepšení mechanických vlastností předlohy. "Hard bake" probíhal při 150 °C po dobu 1 hod.

Během výroby předlohy nastalo několik komplikací, kvůli kterým bylo nutné optimalizovat podmínky stanovené výrobcem SU-8. Doba osvitu byla z původních 20 min prodloužena na 25 min. Kratší doba znamená nedostatečné uvolnění iniciátoru, s tím se pojící i následné nezpolymerování požadovaného vzoru pro kanálek. Delší doba osvitu substrátu iniciací neškodí, nicméně je potřeba z ekonomických důvodů šetřit jak energií, tak UV lampou. Dále je nutné brát na vědomí, že v průběhu osvitu se nesmí s expozičním rámečkem jakkoli manipulovat.

Velmi rizikový krok je také vyvíjení. Vyvíjecí doba doporučená pro tloušťku vrstvy 25 μm činila 5-5,5 min. Vyvíjení ukončené v tomto časovém intervalu ale způsobilo to, že se začaly vymývat až úplně odtrhávat požadované kanálky, což výrazným způsobem znehodnotilo kvalitu i použitelnost fabrikátu. Optimální doba pro vyvíjení byla na základě několika pokusů stanovena na 4,5 min.

Hlavní nevýhodou metody fotolitografie SU-8 je požadavek extrémně čistého prostředí, dále také její choulostivost vůči striktně daným podmínkám, jakákoli změna postupu protokolu byla na kvalitě výrobku ihned znát. Nicméně pokud se fabrikace podaří, je možno předlohu použít pro odlévání opakovaně. Výhoda využitelnosti jednoho výrobku je navíc doplněna i o velkou přesnost vyrobených kanálků a to i v rámci mikro rozměrů.

Obrázek 52 zobrazuje předlohu, která byla vyrobena za optimalizovaných podmínek a následně sloužila v dalším kroku fabrikace čipů – odlévání PDMS.



Obrázek 52: SU-8 předloha pro master vyrobená na základě optimalizovaných podmínek

4.2.3.1 Silanizace

Formu s vystouplými kanálky bylo nutné povrchově upravit. To proto, aby se v dalších krocích z ní mohlo jednoduše sloupnout vytvrzené PDMS, aniž by docházelo k nežádoucímu přilepení. Pro dosažení požadované nepřilnavosti materiálu byl použit trichloro(1H,1H,2H,2Htridekafluoro-n-oktyl)silan, který na povrchu předlohy vytvořil monovrstvu nepřilnavostí podobnou teflonu.

Postup silanizace sestával z následujících kroků: Předloha byla umístěna i s podkladem Petriho misky do exsikátoru. Do krajů misky bylo aplikováno celkem 8 μ l silanu. Po zapnutí vývěvy byl systém po dobu 5 min evakuován. Poté byla předloha umístěna na topnou desku a vypékána při 110 °C po 10 min v případě skla jako podkladu, resp. při 70 °C pro 1 hodinu v případě PS jako podkladu.

Silanizována byla nejen předloha, ale i veškeré povrchy (sklo i PDMS), u kterých by přilepení znemožnilo další výrobní kroky.

4.2.4 Výroba masteru

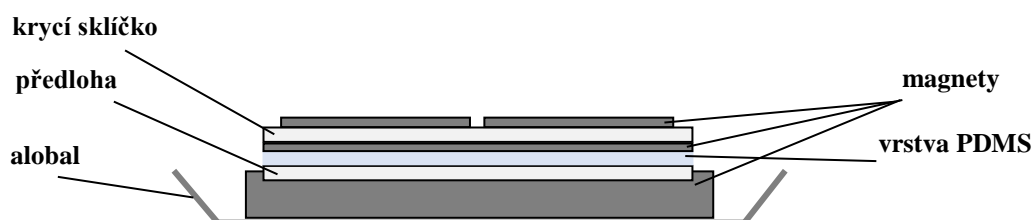
Postup výroby masteru byl z důvodu použitých chemikálií i požadavku na vyšší kvalitu fabrikátu modifikován. Odlitkem z předlohy nejprve vznikly části, vhodné pro kompletaci PDMS čipů. Tyto části byly ale znovu zality PDMS, a až po tomto kroku vznikly formy pro odlévání OSTE.

4.2.4.1 Odlévání PDMS pro tvorbu čipu

Předloha byla umístěna mezi magnet a dva magnetické rámečky s požadovanou tloušťkou 1 mm, tvořící ohraničení pro odlití PDMS. Poté na ni bylo nanášeno takové množství PDMS, aby byly oba rámečky dostatečně zalité. Sylgard 184 je dodáván v sadě, která obsahuje silikonovou odlévací hmotu a síťovací činidlo s iniciátorem. Tyto dvě složky je nutné mísit v poměru 10:1. Protože se jedná o medovitou směs, při míchání vzniká mnoho bublin. Aby se směs zbavila vzduchu, byla po dobu 20 min vystavena evakuování v exsikátoru

Nanesená vrstva byla přikryta sklíčkem tak, aby se nevytvořily žádné bubliny, následně byl celek fixován dalšími magnety. Takto navrstvený systém (viz obrázek 53) byl na topné desce vystaven teplotě 70°C po dobu 1 hod. Magnetická síla zprostředkovala fixaci vrstev během vytvrzení PDMS v požadované tloušťce.

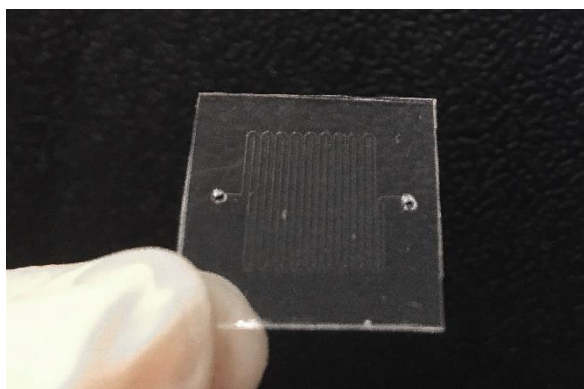
Replika PDMS byla z předlohy sloupnuta a nařezána na jednotlivé čtverce o rozměru 2x2 cm. Do vyznačených míst byly do čipů pomocí kruhového skalpelu vykrojeny vstupy i výstupy pro kapaliny. Z dalšího připraveného PDMS byly vyřezány pro každý jednotlivý čip také zadní strany finálního mikrofluidického zařízení bez vzorů. Všechny PDMS části byly následně očištěny pomocí IP.



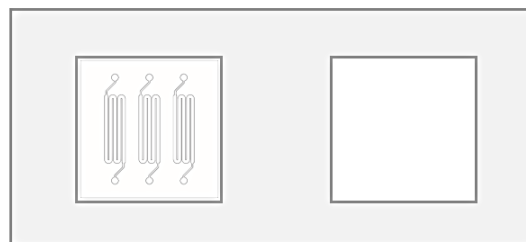
Obrázek 53: Systém vrstvení při fabrikaci PDMS čipů

4.2.4.2 Odlévání PDMS pro tvorbu masteru

Očištěné silikonové části byly poté vystaveny plazmatu, proběhl proces tzv. "plasma bonding". Plazmový generátor Diener ZEPTO byl nastavený na výkon 70 % při tlaku 70 Pa po dobu 1 min. Během expozice byly PDMS části v komoře situovány kanálky dolů. To proto, aby došlo k ošetření pouze zadních stran, které byly vzápětí nalepeny na plazmatem ošetřená podložní sklíčka. Na každé sklíčko se byla vždy nalepena část s kanálkem i zadní strana bez vzoru, viz obrázek 55.



Obrázek 54: Vyřezaná a očištěná část PDMS čipu

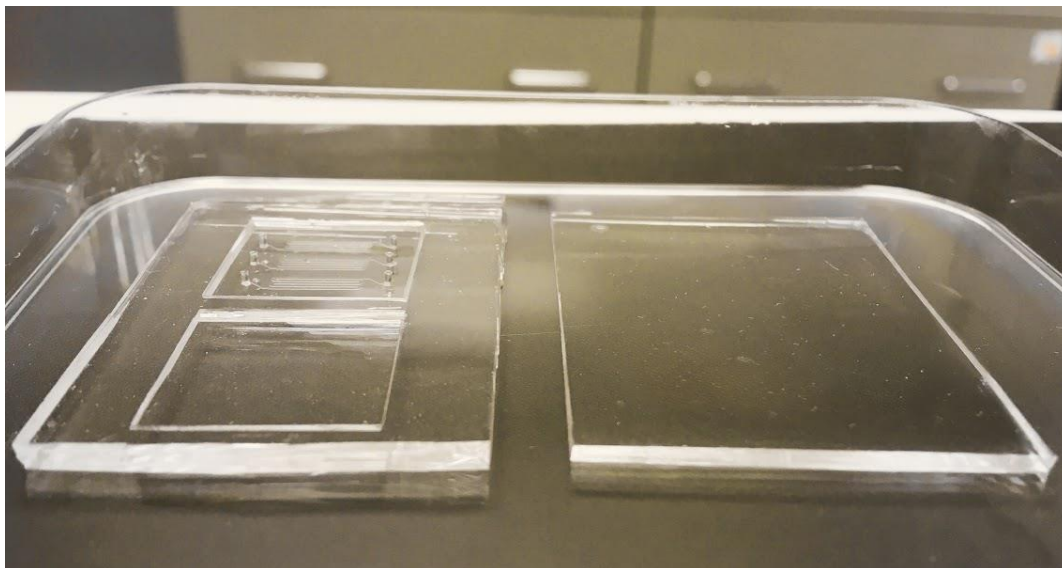


Obrázek 55: Schéma rozložení PDMS na sklíčku

Podkladová skla s připevněnými PDMS částmi byla přilepena oboustrannou lepicí páskou do Petriho misky. Poté byla provedena silanizace a zalití PDMS, které bylo v poměru 10:1 smíchané v takovém množství, aby vznikla vrstva o tloušťce přibližně 5 mm. Zároveň byla připravena i směs na odlití PDMS s tloušťkou vrstvy 3 mm, ze které byly následně vyrobeny horní krycí díly pro jednotlivé formy. Tvrzení probíhalo opět při 70 °C po dobu 1 hod.

Po následném sloupnutí, vyřezání a očištění IP, byly již kompletně zhotoveny mastery pro odlévání OSTE čipů.

Vyrobeny byly celkem 3 formy, každá s kanálky o jiném rozměru. Během fabrikace se při slupování z předlohy jeden z čipů s 200 μm kanálky poničil. Bylo to zapříčiněno pravděpodobně nedokonalou silanizací s následky pevného přilepení PDMS k SU-8 masteru. Tato skutečnost se pojí k jedné z nevýhod mikrofluidiky, a to k nutnosti velmi jemné manipulace s tenkými povrchy. PDMS se může velmi lehce potřhat, také je potřeba dbát na opatrnost při ořezávání materiálu žiletkou. Dalším problémem, se kterým bylo třeba se během fabrikace potýkat, byla neustálá nutnost čištění povrchů od prachu. Jakákoli prachová částice zabrání správnému spojení povrchů a tím způsobí buď nežádoucí bublinu, anebo celkovou nefunkčnost čipu. PDMS se po očištění v IP stává extrémně kluzkým a poté přilnavým, což na chvíli značně komplikuje další manipulaci s tímto materiálem. Dále bylo nutné dbát velké opatrnosti při finálním kroku slupování PDMS, kde mohly být při vyvinutí větší síly velmi snadno utrhnuty milimetrové výstupky nad povrchem, představující vstupy do kanálků. Jednoduchým řešením pro snadnější odlepování PDMS se jeví fabrikace o pár mm tlustších vrstev nebo jednokroková verze fabrikace.



Obrázek 56: Odlévací forma (s kanálky o rozměrech $3 \times 500 \mu\text{m}$) a horní krycí díl před odléváním OSTE

4.2.5 Výroba mikrofluidických čipů

Dále byly fabrikovány čipy z nestechiometrických thiolenů (OSTE), pro zadní část čipu byl kvůli lepším vazebným vlastnostem epoxidových skupin, použit materiál OSTEMER (OSTE+).

4.2.5.1 Odlévání thiolenů

Pro přípravu OSTE bylo nutné nejprve navázat 2 monomery – thiolový a allylový, viz podkapitola 4.2.1 Použité chemikálie. Množství složky 4T („tetrakis“) bylo naváženo tak, aby bylo oproti složce 3A („triallyl“) v 47,5x větším množství. Dále bylo nutné monomery důkladně promísit, k tomu byl využit vortex. Následoval přidavek $10 \mu\text{l}$ 10% ethanolového roztoku fotoiniciátoru TPO-L a další vortexování. Pro eliminaci bublin byla směs po dobu 1 hod vystavena sníženému tlaku v exsikátoru.

Forma očištěná plazmatem a připevněná k PMMA folii, byla umístěna na polykarbonátovou desku zajišťující rovnost (tloušťka 5 mm) pokrytou netkanou utěrkou. Následně bylo do formy nanесeno takové množství OSTE, aby se zcela zaplavila část obsahující vstupy pro kanálky. Druhá polovina formy (zadní část čipu) byla ponechána volná pro pozdější odlévání OSTE+. Zalitý master byl opatrně přiklopen PDMS víčkem, pokryt další netkanou tkaninou a druhým dílem polykarbonátové podložky opatrně stlačen a vylišován. Lisovací krok byl důležitý pro vytlačení přebytku thiolenů. Všechny vrstvy v průběhu odlévání zobrazuje obrázek 57. V expoziční komoře byl master s víčkem vystaven UV osvětlení $700 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$. Poté následovalo odloupení OSTE čipu z formy.



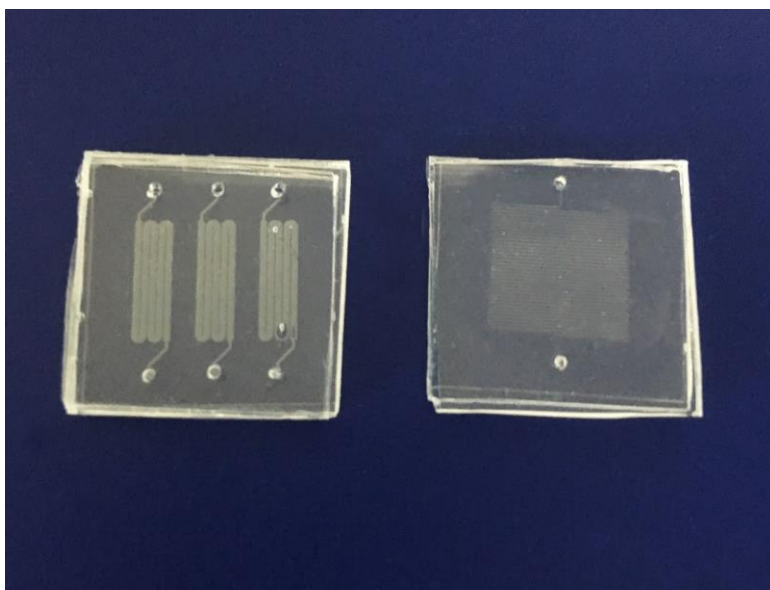
Obrázek 57: Odlévání a lisování OSTE – schéma vrstev

Postup pro zhotovení zadní strany čipu z OSTE+ byl stejný s rozdílem navážky a hodnoty expoziční energie. Navážený OSTEMER sestával dle pokynů výrobce z 1,09x většího množství složky A oproti složce B. Optimalizovaná hodnota energie při expozici činila $1000 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$.

4.2.5.2 Kompletace čipů

Jednotlivé části čipů byly následně spojeny, lehce přimáčknuty k sobě a vloženy mezi mikroskopová sklíčka, potažená PDMS folií. V tomto kroku bylo nejdůležitější situovat díly se vzorem kanálků směrem dovnitř jednotlivých čipů. Takto sestavená skla byla fixována svorkami a vystavena 100°C po dobu 1 hod. Během tohoto kroku proběhlo tepelně iniciované navázání materiálu OSTE+ na OSTE a vytvrzení.

Po vychlazení na LT byla skla rozebrána a OSTE čipy vyjmuty.



Obrázek 58: Ukázka 2/3 fabrikovaných čipů

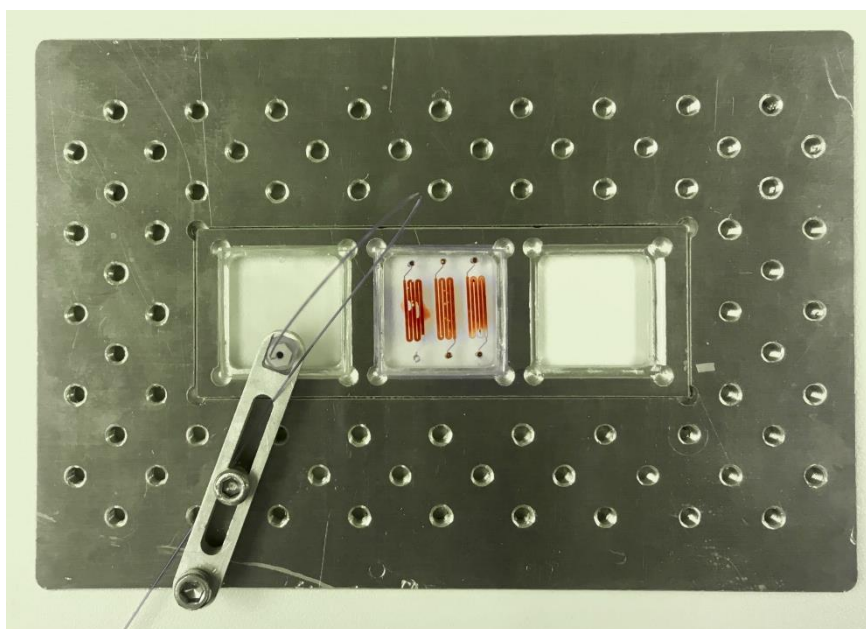
V průběhu fabrikace čipů bylo potřeba optimalizovat hned několik faktorů. Nejen jednotlivé pořadí vrstev při lisování, ale i hodnoty obou expozičních energií. Na odřezky PDMS byly aplikovány kapky OSTE pryskyřice, následně proběhlo několik experimentů pojících se s hledáním optimální hodnoty E. Hodnota $700 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ byla stanovena na základě dostatečného zatuhnutí testovací kapky. Nižší hodnoty E způsobovaly lepivost materiálu, který byl také náchylný k obtiskům při další manipulaci. Spojení dvou OSTE materiálů se během fabrikace nepodařilo, i když byl dodržován protokol s daným postupem. Mohlo to být způsobeno například nedostatečně optimalizovanou energií expozice nebo pomalou manipulací s fabrikovanými částmi. Z důvodu úspory OSTE při dalším testování bylo navrženo řešení: zadní strany čipů fabrikovat z materiálu OSTE+ a obě části následně spojit za zvýšené teploty pomocí epoxidových skupin obsažených v OSTE+. U OSTE+ pryskyřice bylo nutné nalézt takovou hodnotu E UV osvit, aby nedošlo k přílišnému zahřátí materiálu, a tím ke tepelně iniciované reakci epoxidů již při polymeraci. Tato hodnota činila $1000 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$. Největší komplikací při odlévání pryskyřic byly prachové nečistoty, protože způsobovaly nežádoucí vzduchové kapsy při spojování materiálů.

Také bylo nutné dbát na to, jakou stranou díl s kanálky situovat na díl podkladový. V místnosti s redukováným světlem jde jen velmi těžko poznat, která strana čipu je vzorovaná a to i když je objekt pozorován velmi zblízka. U dvou vyrobených čipů tento problém nastal a na stranu s obrácenými kanálky bylo poté třeba nalepit ještě další část OSTE, jako nadstavbu, aby se kanálky finálně uzavřely. Při odlupování OSTE z PDMS formy došlo i při vyvinutí minimální síly k utržení silikonových výstupků a tím ke znehodnocení dvou ze tří PDMS forem. Nicméně vytvoření dalších PDMS forem z připravených masterů je snadné.

V závěru experimentování se podařilo zhotovit celkem 6 mikrofluidických čipů (1x 400/200, 3x 200/100 a 2x 500/125), u kterých byla následně otestována jejich funkčnost.

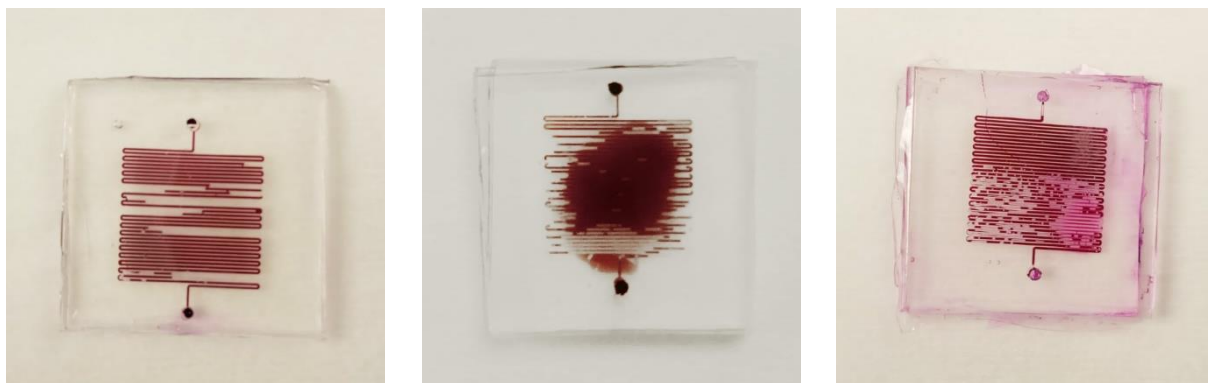
4.2.6 Test funkčnosti mikrofluidických kanálků

Mikrofluidické čipy byly dále usazeny do kovového stojanu a do vstupů byla pomocí komerčních konektorů zapojena křemenná kapilára s polyimidovým povlakem. Poté byl proveden test funkčnosti kanálků průplachem roztoku barviva.

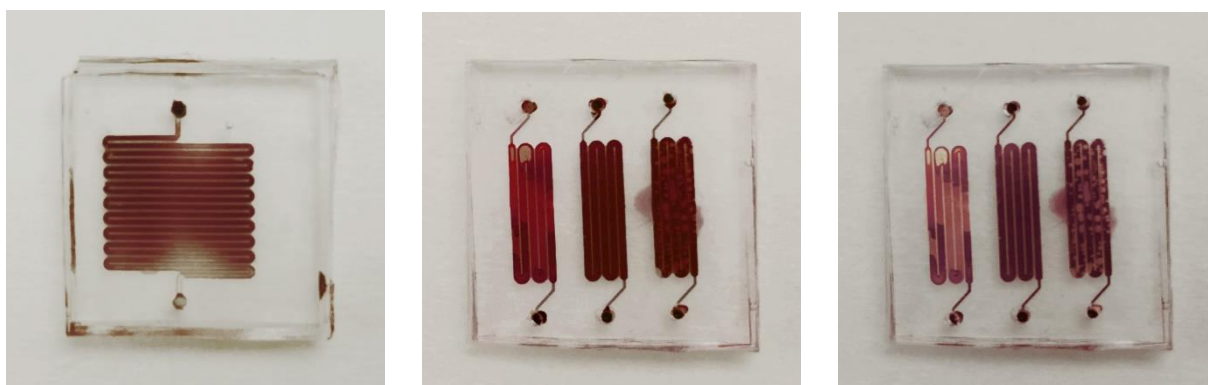


Obrázek 59: Zapojený mikrofluidický čip

Roztokem barviva pyroninu B se povedlo propláchnout všechny kanálky. Jeden z čipů s nejmenší šířkou kanálků (200/100) by kvůli velké vzduchové kapse, která vznikla při spojování 2 kusů OSTE a OSTE+, nebylo možné dále prakticky využívat (viz prostřední čip na obrázku 60). U jiného čipu stejných rozměrů došlo k nedostatečnému bondování OSTE+ na OSTE, což mělo za důsledek odlepení jednotlivých částí čipu od sebe během promývání. Tato komplikace mohla být způsobena např. zreagováním epoxidů už při fotopolymraci nebo nedostatečnou dobou tvrzení čipu na topné desce. Ostatní čipy se jevily jako vhodné pro další testování.



Obrázek 60: Promyté čipy 3x 200/100



Obrázek 61: Promyté čipy 1x 400/200 a 2x 500/125

Postupy přípravy čipů byly optimalizovány a další vyrobené čipy mohou být použity pro imobilizaci mikrosomů a následné sledování biotransformace na modelovém systému v rámci propojení enzymatické a mikrofluidické části experimentální práce. Tímto směrem také bude probíhat navazující výzkum, který však rozsahem převyšuje časovou dotaci diplomové práce.

5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývala optimalizací metod testování enzymatické aktivity spektrofotometricky a sestavením mikrofluidického zařízení pro účely enzymatického reaktoru jako modelu metabolismu potenciálních léčiv v játrech. Experimentální část byla rozdělena do dvou celků, na jejichž propojení bude v budoucnu zaměřen další výzkum.

První část experimentů se zabývala prověřením systému pro testování enzymatické aktivity metodou spektrofotometrie a optimalizací podmínek pro práci s mikrosomy, jakožto nositeli enzymatického komplexu cytochromu P450 zodpovědného za metabolismus xenobiotik. Komplex P450 obsažený v mikrozomech za přítomnosti koenzymu NADPH přeměňoval modelový substrát 7-ethoxykumarin na produkt 7-hydroxykumarin. Jako alternativa k LC-MS/MS, která je používána k analýze kumarinů, byla zvolena a otestována spektrofotometrie. V rámci experimentování byly stanoveny nejen optimální koncentrace všech složek reakční směsi, ale také např. nastavení přístroje a vlnové délky vhodné pro sledování enzymatické aktivity. Tyto hodnoty jsou uvedeny v experimentální části práce. Při hledání vhodných vlnových délek pro měření, bylo potřeba brát v potaz komplikaci, kterou představovala prakticky totožná emisní maxima produktu enzymatické reakce 7-HC a ve směsi přítomného NADPH. Aby tyto látky ve výstupech měření spolu co nejméně interferovaly, bylo nutné zajistit optimální vlnové délky porovnáním jejich excitačních a emisních spekter (optimální excitační vlnová délka byla stanovena na 323 nm a emisní vlnová délka na 450 nm). Poté následovalo sledování enzymatické aktivity směsi. Bylo zjištěno, že přeměnou NADPH na NADP dochází k výraznému poklesu jeho intenzity fluorescence, čímž bylo pro vyhodnocení enzymatické aktivity znemožněno využití konvenční metody sledováním intenzity fluorescence při zvolených vlnových délkách. Proto bylo navrženo řešení v podobě prokládání spekter pomocí řešitele programu MS Excel. Vyhodnocování touto metodou bylo sice časově náročnější než by bylo metodou klasickou, nicméně bylo dosaženo dostačujících výsledků, a to i přes vzniklé komplikace. Koncentrace 7-HC za přítomnosti 7-EC i NADPH stoupala, naopak substrát 7-EC v průběhu reakce ubýval. Sledováním enzymatické aktivity byla prokázána funkčnost mikrosomů.

Do budoucna by bylo dobré zvážit v rámci výzkumu enzymatické aktivity CYP aplikaci jiného modelového systému, ve kterém by se jednotlivé složky během reakce spektrálně tolik nepřekrývaly. Literatura uvádí, že je k tomuto účelu vhodné např. využití modelu resorufinů, které mají oblast fluorescence posunutou do viditelné oblasti [91]. Také je možné, že při použití regenerativního systému NADP, glukóza-6-dehydrogenázy se zdrojem energie glukózou-6-fosfátem by NADPH v průběhu reakce nevykazovalo takovou míru nestability a jeho koncentrace by při vhodné volbě směsi mohla být takřka stabilní [75]. Řešením by mohlo být i použití separační metody před vlastní detekcí nebo použití úplně odlišné metody analýzy a detekce signálu.

Po ověření funkčnosti mikrosomů následovala druhá část experimentování v oblasti mikrofluidiky. Nejprve byla optimalizována metoda výroby SU-8 předloh. Stanovena byla vhodná doba osvitu i vyvíjení fotorezistu. Poté byly ve víceetapovém postupu fabrikovány PDMS formy, do kterých byly následně odlévány OSTE čipy. Pro zadní stany čipů se využíval i materiál OSTE+. Bylo vyrobeno 6 mikrofluidických čipů, jejichž funkčnost byla otestována průplachem kanálek. Pro lepší vizualizaci experimentu bylo využito barvivo pyronin B.

Všechny čipy byly úspěšně promyty, nicméně spojování částí s kanálky s krycí částí nebylo vždy zcela úspěšné a některé čipy mají kanálky sice průchodné, ale obsahující vzduchové kapsy. Jako největší komplikace se při fabrikaci čipů ukázaly prachové nečistoty, které při spojování materiálů mohly zajistit celkovou nefunkčnost výrobku, dále také nutnost striktního dodržování všech podmínek postupů i potřeba velmi jemného zacházení s fabrikáty při všech krocích výroby. Optimalizované hodnoty pro energie UV osvitů a doby tvrzení se v případě většiny zařízení, jevily jako dostačující, pro materiál OSTE+ by bylo do budoucna vhodné hodnoty UV energie osvitu optimalizovat tak, aby s jistotou nedocházelo k přehřátí při fotopolymeraci, a tím ke spotřebování tepelně iniciovaného kroku již v UV komoře. Na základě optimalizace podmínek v druhé části experimentální práce, mohou být postupy výroby čipů dále použity pro testování imobilizačních technik mikrosomů a následné sledování biotransformace na modelovém systému v rámci propojení enzymatické a mikrofluidické části experimentální práce.

Když se zaměříme na nedávné výzkumy a mikrofluidická zařízení která vstupují na trh, můžeme si být jisti, že LoC v blízké budoucnosti změní způsob diagnostiky onemocnění a také testování léčiv. Mikrofluidika, jako stále v celku mladý a hlavně perspektivní obor se v nejbližší budoucnosti bude zabývat zejména problematikou standardizace výzkumných postupů. Mikrofluidní systémy mohou výrazně obohatit mnoho vědních oborů a konkrétně v biomedicině nabízí čím dál detailnější poznání lidského těla na úrovni tkání i buněk. Čipy jsou vyráběny ze stále biokompatibilnějších materiálů, nízkonestechiometrický OSTE je toho důkazem. Vizí do budoucna je rozvinutí technologie natolik, aby bylo možné modelovat jednotlivé orgánové soustavy na čipu, díky čemuž by se jednoho dne mohlo podařit ustoupit od kontroverzního a často neefektivního testování léčiv na zvířatech.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] SACKMANN, Eric K., Anna L. FULTON, David J. BEEBE a Andreas MANZ. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*. 2014, **507**(7491), 181-189. DOI: 10.1038/nature13118. ISSN 0028-0836.
- [2] WHITESIDES, George M., Anna L. FULTON, David J. BEEBE a Andreas MANZ. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006, c2008, **442**(7101), 368-373. DOI: 10.1038/nature05058. ISSN 0028-0836.
- [3] REYES, Darwin R., Dimitri IOSSIFIDIS, Pierre-Alain AUROUX a Andreas MANZ. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. *Analytical Chemistry*. 2002, **74**(12), 2623-2636. DOI: 10.1021/ac0202435. ISSN 0003-2700.
- [4] LI, Dongqing, Anna L. FULTON, David J. BEEBE a Andreas MANZ. Encyclopedia of microfluidics and nanofluidics. *Nature*. 2014, c2008, **507**(7491), 181-189. DOI: 0387324682. ISSN 0028-0836.
- [5] Lab on chip PCR (1). In: *Gene quantification* [online]. [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <https://www.gene-quantification.de/lab-on-chip.html>
- [6] BEEBE, David J., Glennys A. MENSING a Glenn M. WALKER. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2002, **4**(1), 261-286. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916. ISSN 1523-9829.
- [7] VAN DER MEER, A. D., A. A. POOT, M. H. G. DITS, J. FEIJEN a I. VERMES. Microfluidic Technology in Vascular Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, **2009**(1), 1-10. DOI: 10.1155/2009/823148. ISSN 1110-7243.
- [8] Intorduction to lab-on-a-chip 2015: review, history and future. In: *Elveflow: Plug&Play Microfluidics* [online].[cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/introduction-to-lab-on-a-chip-2015-review-history-and-future/>
- [9] Researchers produce smallest ever 3D printed microfluidic "lab on a chip" device. In: *3ders: 3D printer and 3D printing news* [online]. 2017 [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <http://www.3ders.org/articles/20170811-researchers-produce-smallest-ever-3d-printed-microfluidic-lab-on-a-chip-device.html>
- [10] YANG, Xiaoxi, Omid FOROUZAN, Jennie M. BURNS, Sergey S. SHEVKOPLYAS a I. VERMES. Traffic of leukocytes in microfluidic channels with rectangular and rounded cross-sections. *Lab on a Chip*. 2011, **11**(19), 1-10. DOI: 10.1039/c1lc20293f. ISSN 1473-0197.
- [11] Lab on Chip PCR - LOC PCR (1). In: *Gene quantification*[online]. 2017 [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <https://www.gene-quantification.de/lab-on-chip.htm>
- [12] EL-ALI, Jamil, Peter K. SORGER a Klavs F. JENSEN. Cells on chips. *Nature*. 2006, **442**(7101), 403-411. DOI: 10.1038/nature05063. ISSN 0028-0836.
- [13] VILKNER, Torsten, Dirk JANASEK a Andreas MANZ. Micro Total Analysis Systems. Recent Developments. *Analytical Chemistry*. 2004, **76**(12), 3373-3386. DOI: 10.1021/ac040063q. ISSN 0003-2700.

- [14] ALLEN, Michael. Microfluidic chip can detect HIV and MRSA. In: *Physicsworld* [online]. Bristol, 03 Apr 2017 [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <https://physicsworld.com/a/microfluidic-chip-can-detect-hiv-and-mrsa/>
- [15] CHIN, Curtis D, Tassaneewan LAKSANASOPIN, Yuk Kee CHEUNG, et al. Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world. *Nature Medicine*. 2011, **17**(8), 1015-1019. DOI: 10.1038/nm.2408. ISSN 1078-8956.
- [16] Blood vessels on a chip make the cause of dementia visible. *Universiteit Leiden* [online]. Leiden, 2017 [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <https://www.universiteitleiden.nl/en/research-dossiers/vascular-and-regenerative-medicine/blood-vessels-on-a-chip-make-the-cause-of-dementia-visible>
- [17] DOUGHERTY, Elisabeth. Living, breathing human lung-on-chip: A potential drug-testing alternative. *Wyss Institute* [online]. Harvard University, 2010 [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <https://wyss.harvard.edu/living-breathing-human-lung-on-a-chip-a-potential-drug-testing-alternative/>
- [18] Blood-vessel-on-a-chip provides insight into new anti-inflammatory drug candidate. In: *Radical Science News* [online]. 2018 [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <https://www.radicalsciencenews.org/tag/endothelial/>
- [19] WONG, Jeong a Chih-Ming HO. Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2009, **7**(3), 291-306. DOI: 10.1007/s10404-009-0443-4. ISSN 1613-4982.
- [20] MCDONALD, J. Cooper a George M. WHITESIDES. Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices. *Accounts of Chemical Research*. 2002, **35**(7), 491-499. DOI: 10.1021/ar010110q. ISSN 0001-4842.
- [21] Physics Central: learn how your world works [online]. *American Physical Society* [online], 2016 [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <http://www.physicscentral.com>
- [22] HILLBORG, H., J.F. ANKNER, U.W. GEDDE, G.D. SMITH, H.K. YASUDA a K. WIKSTRÖM. Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques. *Polymer*. 2000, **41**(18), 6851-6863. DOI: 10.1016/S0032-3861(00)00039-2. ISSN 00323861.
- [23] DONZEL, C., M. GEISLER, A. BERNARD, H. WOLF, B. MICHEL, J. HILBORN a E. DELAMARCHE. Hydrophilic Poly(dimethylsiloxane) Stamps for Microcontact Printing. *Advanced Materials*. Weinheim: WILEY-VCH, 2001, **13**(15), 1164-1167. DOI: 10.1002/1521-4095(200108)13:15<1164::AID-ADMA1164>3.0.CO;2-S.
- [24] LEE, Jessamine Ng, Cheolmin PARK a George M. WHITESIDES. Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. *Analytical Chemistry*. 2003, **75**(23), 6544-6554. DOI: 10.1021/ac0346712. ISSN 0003-2700.
- [25] BAREL, A. O., Marc PAYE a Howard I. MAIBACH. *Handbook of cosmetic science and technology*. Fourth edition. Boca Raton, 2014. ISBN 978-184-2145-647.

- [26] HÖFER, Rainer, Franz JOST, Milan J. SCHWUGER, Rolf SCHARF, Jürgen GEKE, Josef KRESSE, Herbert LINGMAN, Rudolf VEITENHANS� a Werner ERWIED. Foams and Foam Control. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000. DOI:10.1002/14356007.a11_465
- [27] TOTTEY, Leah S., Sally A. COULSON, Gerhard E. WEVERS, Laura FABIAN, Heather MCCLELLAND a Mickayla DUSTIN. Persistence of Polydimethylsiloxane Condom Lubricants. *Journal of Forensic Sciences* [online]. 2019, **64**(1), 207-217 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1111/1556-4029.13816. ISSN 00221198.
- [28] CARLBORG, Carl Fredrik, Tommy HARALDSSON, Kim ÖBERG, Michael MALKOCH a Wouter VAN DER WIJNGAART. Beyond PDMS: off-stoichiometry thiol-ene (OSTE) based soft lithography for rapid prototyping of microfluidic devices. *Lab on a Chip*. 2011, **11**(18). DOI: 10.1039/c1lc20388f. ISSN 1473-0197.
- [29] HOYLE, Charles E., Tai Yeon LEE a Todd ROPER. Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2004, **42**(21). DOI: <https://doi.org/10.1002/pola.20366>.
- [30] LAFLEUR, Josiane P., Radosław KWAPISZEWSKI, Thomas G. JENSEN a Jörg P. KUTTER. Rapid photochemical surface patterning of proteins in thiol-ene based microfluidic devices. *The Analyst*. 2013, **138**(3), 845-849. DOI: 10.1039/C2AN36424G. ISSN 0003-2654.
- [31] NATALI, Marco, Stefano BEGOLO, T. CAROFIGLIO a Giampaolo MISTURA. Rapid prototyping of multilayer thiolene microfluidic chips by photopolymerization and transfer lamination. *Lab on a Chip* [online]. 2008, **8**(3) [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1039/b716594c. ISSN 1473-0197.
- [32] PRAKASH, Shaurya a Junghoon YEOM. *Nanofluidics and microfluidics: systems and applications*. Waltham: William Andrew, 2014. ISBN 978-1-4377-4469-9.
- [33] ZANDI SHAFAGH, Reza, Alexander VASTEŠSON, Weijin GUO, Wouter VAN DER WIJNGAART a Tommy HARALDSSON. E-Beam Nanostructuring and Direct Click Biofunctionalization of Thiol-Ene Resist. *ACS Nano*. 2018, **12**(10), 9940-9946. DOI: 10.1021/acsnano.8b03709. ISSN 1936-0851.
- [34] STICKER, Drago, Mario ROTHBAUER, Sarah LECHNER, Marie-Therese HEHENBERGER a Peter ERTL. Multi-layered, membrane-integrated microfluidics based on replica molding of a thiol-ene epoxy thermoset for organ-on-a-chip applications. *Lab on a Chip*. 2015, **15**(24), 4542-4554. DOI: 10.1039/C5LC01028D. ISSN 1473-0197.
- [35] SARTHAK, Basak. OSTEmer steps. In: *Wikipedia.org* [online]. 2014 [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Off-stoichiometry_thiol-ene_polymer#/media/File:OSTEmer_steps.png
- [36] KWISNEK, Luke, Sergei NAZARENKO a Charles E. HOYLE. Oxygen Transport Properties of Thiol-Ene Networks. *Macromolecules* [online]. 2009, **42**(18), 7031-7041 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1021/ma901117s. ISSN 0024-9297.
- [37] MosaicBio [online]. Boulder: *Mosaic Biosciences*, 2019 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://www.mosaicbio.com/technology/>

- [38] VELVE-CASQUILLAS, Guilhem, Maël LE BERRE, Matthieu PIEL a Phong T. TRAN. Microfluidic tools for cell biological research. *Nano Today*. 2010, **5**(1), 28-47. DOI: 10.1016/j.nantod.2009.12.001. ISSN 17480132.
- [39] VOLDMAN, Joel, Martha L. GRAY a Martin A. SCHMIDT. Microfabrication in Biology and Medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 1999, **1**(1), 401-425. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.1.1.401. ISSN 1523-9829.
- [40] LÉCUYER, Christophe a David C. BROCK. *Makers of the microchip: a documentary history of Fairchild Semiconductor*. Cambridge, Mass.: MIT Press, 2010. ISBN 978-0262014243.
- [41] Photolithography. In: *Cellular and molecular biomechanics laboratory* [online]. London, 2017 [cit. 2018-12-09]. Dostupné z: <http://biomechanicalregulation-lab.org/photolithography/>
- [42] SEED, Brian. Silanizing Glassware. *Current Protocols in Cell Biology* [online]. 2000, **8**(1) [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1002/0471143030.cba03es08. ISSN 19342500.
- [43] SHUN'KO, E. V. a V. S. BELKIN. Cleaning properties of atomic oxygen excited to metastable state 2s22p4(S10). *Journal of Applied Physics*. 2007, **102**(8). DOI: 10.1063/1.2794857. ISSN 0021-8979.
- [44] SUBRAMANI, K. Fabrication of hydrogel micropatterns by soft photolithography. *Emerging Nanotechnologies for Manufacturing*. Elsevier, 2015, 2015, , 279-293. DOI: 10.1016/B978-0-323-28990-0.00011-7. ISBN 9780323289900.
- [45] Nanobiotechnologie a biosensory při studiu biointerakcí: zpřístupnění moderní technologie odborníkům v biologii. *Nanobio* [online]. Brno: Masarykova univerzita [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: http://www.nanobio.cz/sschool-2011/cviceni/L1_Prakticka-imobilizace.pdf
- [46] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [47] CAMMACK, Richard. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Rev. ed. New York: Oxford University Press, 2006. ISBN 01-985-2917-1.
- [48] SUZUKI H. "Chapter 8: Control of Enzyme Activity". *How Enzymes Work: From Structure to Function*. Boca Raton, FL: CRC Press. 2015. pp. 141–69. ISBN 978-981-4463-92-8.
- [49] CORNELL, Brent. The Lock and Key Model. In: *BioNinja* [online]. 2007 [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <http://www.vce.bioninja.com.au/aos-1-molecules-of-life/biochemical-processes/enzymes.html>
- [50] CHAPLIN, Martin a Christopher BUCKE. *Enzyme Technology: Enzyme Reactors* [online]. 2014 [cit. 2019-05-01].
- [51] MERYAM SARDAR, Razi Ahmad. *Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix*. 2015, **04**(02). DOI: 10.4172/2161-1009.1000178. ISSN 21611009.

- [52] BRENA, Beatriz, Paula GONZÁLEZ-POMBO a Francisco BATISTA-VIERA. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, 2013-7-10, , 15-31. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-62703-550-7_2. ISBN 978-1-62703-549-1.
- [53] ZAUSHITSYNA, Oksana, Dmitriy BERILLO, Harald KIRSEBOM a Bo MATTIASSON. Cryostructured and Crosslinked Viable Cells Forming Monoliths Suitable for Bioreactor Applications. *Topics in Catalysis*. 2014, **57**(5), 339-348. DOI: 10.1007/s11244-013-0189-9. ISSN 1022-5528.
- [54] MELLER, Kinga, Michał SZUMSKI, Bogusław BUSZEWSKI a François FAJULA. Microfluidic reactors with immobilized enzymes—Characterization, dividing, perspectives. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2017, **244**(2), 84-106 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1016/j.snb.2016.12.021. ISSN 09254005.
- [55] FOO, Hsiao Ching, Norman W. SMITH a Shawn M.R. STANLEY. Fabrication of an on-line enzyme micro-reactor coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the digestion of recombinant human erythropoietin. *Talanta*. 2015, **135**, 18-22. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.12.033. ISSN 00399140.
- [56] MIN, Qianhao, Ren'an WU, Liang ZHAO, Hongqiang QIN, Mingliang YE, Jun-Jie ZHU a Hanfa ZOU. Size-selective proteolysis on mesoporous silica-based trypsin nanoreactor for low-MW proteome analysis. *Chemical Communications*. 2010, **46**(33). DOI: 10.1039/c0cc00619j. ISSN 1359-7345.
- [57] SHI, Jing, Wenwen ZHAO, Yuanfang CHEN, Liping GUO a Li YANG. A replaceable dual-enzyme capillary microreactor using magnetic beads and its application for simultaneous detection of acetaldehyde and pyruvate. *ELECTROPHORESIS*. 2012, **33**(14), 2145-2151. DOI: 10.1002/elps.201200090. ISSN 01730835.
- [58] SACHSE, Alexander, Anne GALARNEAU, Bernard COQ a François FAJULA. Monolithic flow microreactors improve fine chemicals synthesis. *New Journal of Chemistry* [online]. 2011, **35**(2) [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1039/c0nj00965b. ISSN 1144-0546.
- [59] WU, ShuaiBin, JunFeng MA, KaiGuang YANG, JinXiang LIU, Zhen LIANG, LiHua ZHANG a YuKui ZHANG. A novel organic-inorganic hybrid monolith for trypsin immobilization. *Science China Life Sciences*. 2011, **54**(1), 54-59. DOI: 10.1007/s11427-010-4108-z. ISSN 1674-7305.
- [60] FU, Lung-Ming, Wei-Jhong JU, Ruey-Jen YANG a Yao-Nan WANG. Rapid prototyping of glass-based microfluidic chips utilizing two-pass defocused CO₂ laser beam method. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2013, **14**(3-4), 479-487. DOI: 10.1007/s10404-012-1066-8. ISSN 1613-4982.
- [61] RODRÍGUEZ-RUIZ, Isaac, Dimitri RADAJEWSKI, Sophie CHARTON, Nhat PHAMVAN, Martha BRENNICH, Petra PERNOT, Françoise BONNETÉ a Sébastien TEYCHENÉ. Innovative High-Throughput SAXS Methodologies Based on Photonic Lab-on-a-Chip Sensors: Application to Macromolecular Studies. *Sensors*. 2017, **17**(6). DOI: 10.3390/s17061266. ISSN 1424-8220.

- [62] TEMIZ, Yuksel, Robert D. LOVCHIK, Govind V. KAIGALA a Emmanuel DELAMARCHE. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab?. *Microelectronic Engineering*. 2015, **132**, 156-175. DOI: 10.1016/j.mee.2014.10.013. ISSN 01679317.
- [63] ROIG, Manuel G, J Felipe BELLO, Fernando G VELASCO, Carmen D DE CELIS a Juan M CACHAZA. Biotechnology and applied biology section applications of immobilized enzymes. *Biochemical Education* [online]. 1997, **15**(4), 198-208 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1016/0307-4412(87)90011-2. ISSN 03074412.
- [64] KRMENČÍK, Pavel a Jiří KYSILKA. Toxikon: Biotransformace. *Biotox* [online]. 2010 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: http://www.biotox.cz/toxikon/toxikologie/j_transformace.php
- [65] EYBL, Vladislav. *Vybrané kapitoly z obecné farmakologie*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0679-8.
- [66] ASHAUER, Roman, Anita HINTERMEISTER, Isabel O'CONNOR, Maline ELUMELU, Juliane HOLLENDER a Beate I. ESCHER. Significance of Xenobiotic Metabolism for Bioaccumulation Kinetics of Organic Chemicals in *Gammarus pulex*. 2012, **46**(6), 3498-3508. DOI: 10.1021/es204611h. ISSN 0013-936X.
- [67] AMADI, Peter Uchenna, Charity OGUNKA NNOKA a Bene Willie ABBEY. Biotransformation of plantain pseudostem fibres using local enzyme sources; analysis of their potential as commercial poultry feed. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2018, **37**(3), 224-232. DOI: 10.1080/10242422.2018.1532412. ISSN 1024-2422.
- [68] INGELMAN-SUNDBERG, Magnus a Sarah C. SIM. Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, **396**(1), 90-94. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.162. ISSN 0006291X.
- [69] NEBERT, DANIEL W., DAVID R. NELSON, MILTON ADESNIK, et al. The P450 Superfamily: Updated Listing of All Genes and Recommended Nomenclature for the Chromosomal Loci. *DNA*. 1989, **8**(1), 1-13. DOI: 10.1089/dna.1.1989.8.1. ISSN 0198-0238.
- [70] JOHNSTON, Wayne A., Dominic J. B. HUNTER, Christopher J. NOBLE, Graeme R. HANSON, Jeanette E. STOK, Martin A. HAYES, James J. DE VOSS a Elizabeth M. J. GILLAM. Cytochrome P450 Is Present in Both Ferrous and Ferric Forms in the Resting State within Intact *Escherichia coli* and Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, **286**(47), 40750-40759. DOI: 10.1074/jbc.M111.300871. ISSN 0021-9258.
- [71] *Interakce cytochromu P450* [online]. In: . Lékařská fakulta v Hradci Králové, 2013 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/P450.htm>
- [72] KUČERA, F. Reakční cyklus enzymatického systému cytochromu P450. In: *ZAM: Zdravotnictví a medicína* [online]. 2006 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/enzymaticky-system-cytochromu-p450-170727>
- [73] PDB 1W0E. Ribbon diagram of human cytochrome P450 isozyme 3A4. In: *Wikipedia.org* [online]. Wikipedia, 2006 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: https://fr.wikipedia.org/wiki/CYP3A4#/media/File:CYP3A4_PDB1W0E.png

[74] STAŇKOVÁ, Pavla, Otto KUČERA, Halka LOTKOVÁ, Tomáš ROUŠAR, René ENDLICHER a Zuzana ČERVINKOVÁ. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicology in Vitro*. 2010, **24**(8), 2097-2103. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.06.011. ISSN 08872333.

[75] In Vitro Products & Reagents 2017-2018 Technology Guide. *Sekisui XenoTech* [online]. Kansas, USA, 2018 [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: <https://www.xenotech.com/books/product-technology-guide-2017-2018>

[76] SAKAI-KATO, Kumiko, Masaru KATO a Toshimasa TOYO'OKA. On-line drug-metabolism system using microsomes encapsulated in a capillary by the sol-gel method and integrated into capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 2002, **308**(2), 278-284. DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00231-2. ISSN 00032697.

[77] LANGENFELD, Elmar, Ulrich M. ZANGER, Klaus JUNG, Helmut E. MEYER a Katrin MARCUS. Mass spectrometry-based absolute quantification of microsomal cytochrome P450 2D6 in human liver. *PROTEOMICS*. 2009, **9**(9), 2313-2323. DOI: 10.1002/pmic.200800680. ISSN 16159853.

[78] JURICA, Jan a Alexandra SULCOV. Determination of Cytochrome P450 Metabolic Activity Using Selective Markers. *Topics on Drug Metabolism*. InTech, 2012, 2012-02-22. DOI: 10.5772/30236. ISBN 978-953-51-0099-7.

[79] KUČERA, F. *Enzymatický systém cytochromu P450* [online]. 2006 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/enzymaticky-system-cytochromu-p450-170727>

[80] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 978-0387-31278-1.

[81] HOFMANN, Andreas, Anne SIMON, Tanja GRKOVIC a Malcolm JONES. *Methods of Molecular Analysis in the Life Sciences*. 2014. DOI: 10.1017/CBO9781107045224.

[82] Fluorescenční spektrofotometrie a její aplikace v materiálově orientovaných vědách. In: *Digilib* [online]. Zlín: Univerzita Tomáše Bati [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/11412/gremlica_2010_bp.pdf?sequence=1&isAllowed=y

[83] *LAB Guide Průvodce laboratoří: Fluorochromy* [online]. In: . [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://labguide.cz/fluorochromy/>

[84] TURNER, Nicholas J. Dealkylation of 7-ethoxycoumarin to form 7-hydroxycoumarin. In: *ResearchGate* [online]. Edinburgh, 2002 [cit. 2019-03-07]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Biotransformation-of-7-ethoxycoumarin-by-a-recombinant-strain-of-E-coli-expressing-the_fig2_11293213

[85] KAWAI, Shigeyuki a Kousaku MURATA. Structure and Function of NAD Kinase and NADP Phosphatase: Key Enzymes That Regulate the Intracellular Balance of NAD(H) and NADP(H). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014, **72**(4), 919-930. DOI: 10.1271/bbb.70738. ISSN 0916-8451.

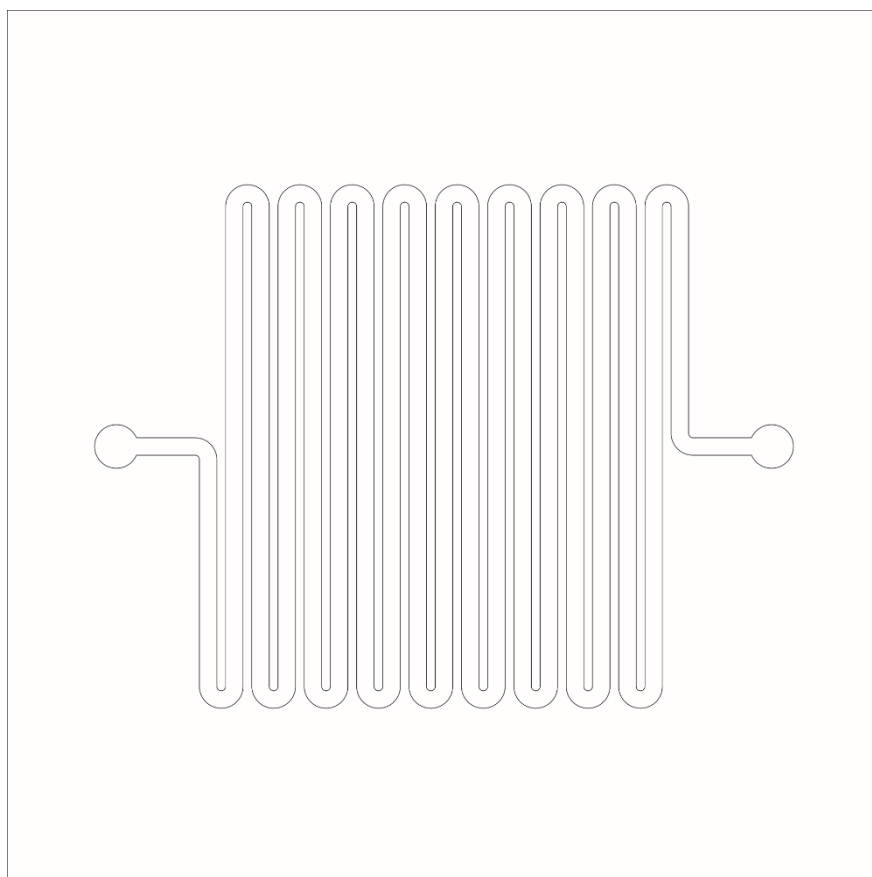
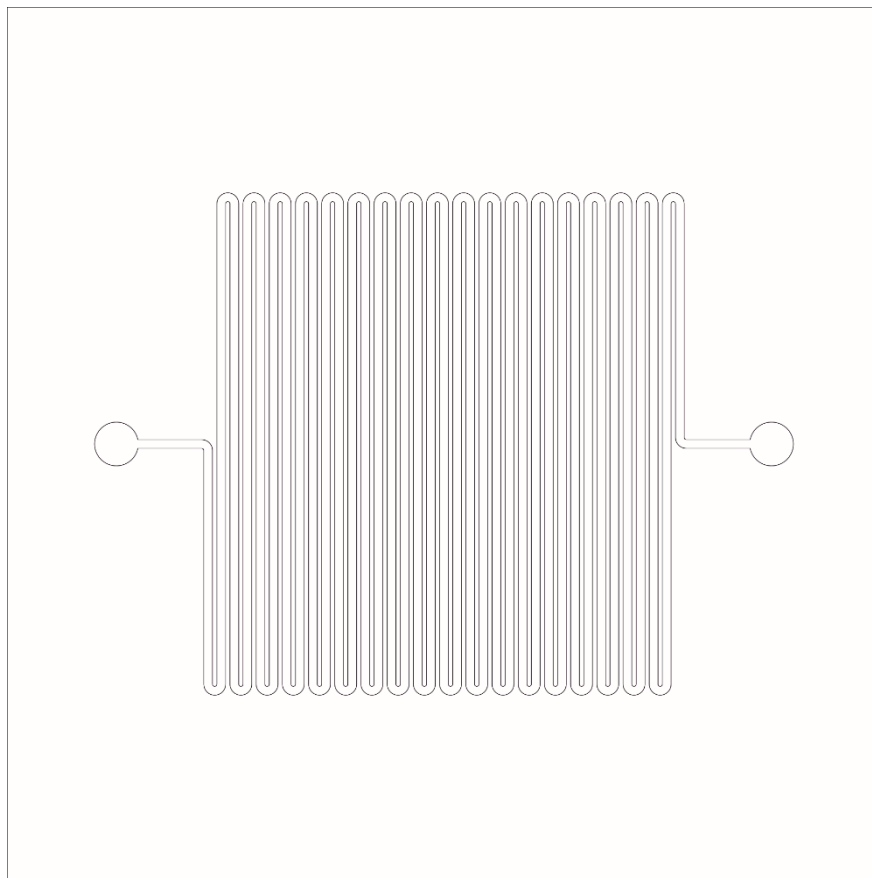
- [86] BEJNAH. NADPH 3D balls. In: *Wikipedia.org* [online]. Wikipedia, 2007 [cit. 2019-03-09]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:NADPH-3D-balls.png>
- [87] GIL, Andres, David SIEGEL, Hjalmar PERMENTIER, Dirk-Jan REIJNGOUD, Frank DEKKER a Rainer BISCHOFF. Stability of energy metabolites-An often overlooked issue in metabolomics studies: A review. *ELECTROPHORESIS*. 2015, **36**(18), 2156-2169. DOI: 10.1002/elps.201500031. ISSN 01730835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201500031>
- [88] *1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, Pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate)* [online]. In: . Sigma Aldrich [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/114235?lang=en&ion=CZ&cm_sp=Insite_-_prodRecCold_xviews_-_prodRecCold5-3
- [89] HOW TO DO AN EPOXY SU-8 MOLD?: The SU-8 mold fabrication process: tips and tricks. In: *Elveflow: Plug&Play Microfluidics* [online]. [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/>
- [90] BEH, Khi Khim, Fahmi SAMSURI, Tze Pin LEE a Khairudin MOHAMED. The Fabrication of PDMS mould for Microelectrode Array Biochip using NIL. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2016, **114**. DOI: 10.1088/1757-899X/114/1/012026. ISSN 1757-8981.
- [91] RADENAC G., COTEUR G., DANIS B., DUBOIS P., WARNAU M. Fluorimetric measurement of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity. Caution about the spectral characteristics of the standards used. *Marine Biotechnology*, Springer Verlag (Germany), 2004, pp.307-311. <10.1007/s10126-004-3014-4>.
- [92] LAFLEUR, Josiane P., Silja SENKBEIL, Jakub NOVOTNY, Gwenaél NYS, Nanna BØGELUND, Kasper D. RAND, Frantisek FORET a Jörg P. KUTTER. Rapid and simple preparation of thiol-ene emulsion-templated monoliths and their application as enzymatic microreactors. *Lab on a Chip*. 2015, **15**(10), 2162-2172. DOI: 10.1039/C5LC00224A. ISSN 1473-0197.

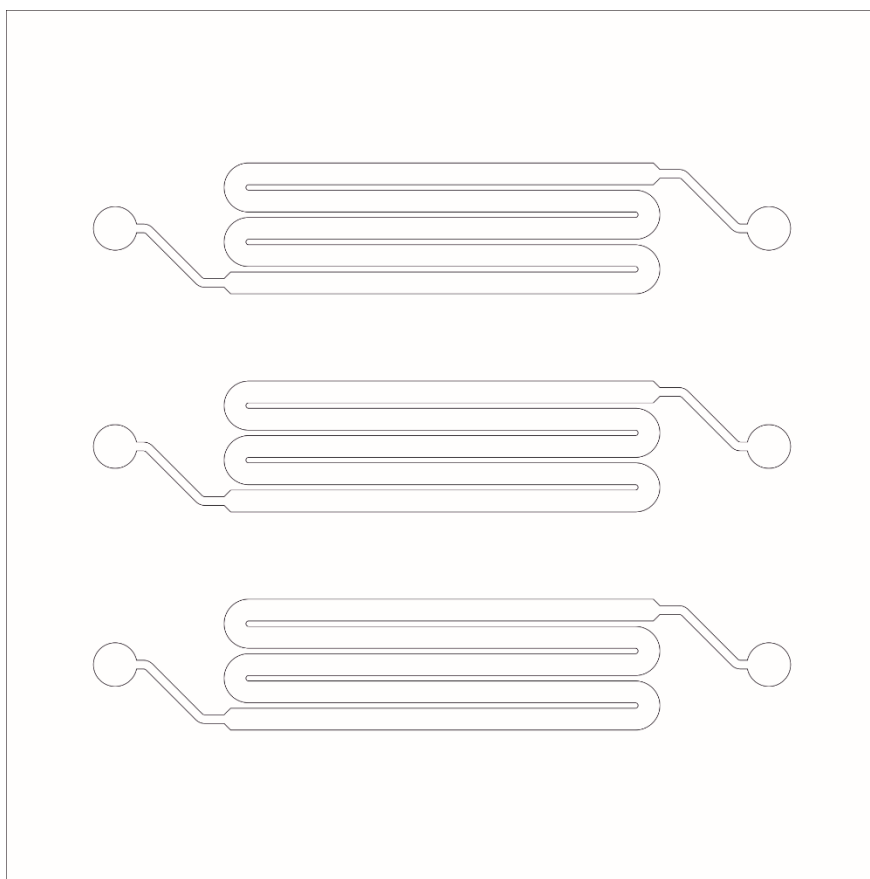
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

7-EC	7-ethoxykumarin
7-HC	7-hydroxykumarin
CE	capillary electrophoresis (kapilární elektroforéza)
CYP	cytochrom P450
DLP-SLA	digital light processing stereolithography
E	energie
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
ER	endoplasmatické retikulum
FDM	fused deposition modelling (modelování depozicí taveniny)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IMER	mikroreaktory s imobilizovanými enzymy
IP	izopropanol
IR	infrared (infračervené záření)
LoC	lab-on-a-chip (laboratoř na čipu)
LT	laboratorní teplota
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát – redukováná forma
NNLS	non-negative least squares
OoC	organ-on-a-chip (orgán na čipu)
OSTE	off-stoichiometry thiol-ene (nestechiometrické thiol-eny)
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)
PC	polykarbonát
PDMS	polydimethylsiloxan
PEB	post-exposure bake (tvrzení)
PET	polyethylentereftalát
PMMA	polymethylmetakrylát
PS	polystyren
RLM	rat liver microsomes (mikrosomy z krysích jater)
UV	ultraviolet (ultrafialové záření)

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Detail designů jednotlivých čipů





*Poznámka k rozměrům: (1) 200 μm kanálky/100 μm mezery; (2) 400/200 μm ; (3) 500/125 μm , 3x;
vstupy $d=1\text{ mm}$*